

Medienoptimierung zur Kostenreduktion der mikrobiellen Konversion von Glycerin zu 1,3-Propandiol

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines

Doktor der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Erik Wilkens geb. Mildner
aus Merseburg

1. Referent:

2. Referent:

eingereicht am:

mündliche Prüfung (Disputation) am:

Professor Dr. Klaus-Dieter Vorlop

apl. Professor Dr. Siegmund Lang

21.12.2011

13.07.2012

Druckjahr 2012

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Wilkins E, Ringel AK, Hortig D, Willke T, Vorlop KD (2012) High-level production of 1,3-propanediol from crude glycerol by *Clostridium butyricum* AKR102a. Appl Microbiol Biotechnol 93 (3): 1057-1063

Ringel AK, Wilkins E, Hortig D, Willke T, Vorlop KD (2012) An improved screening method for microorganisms able to convert crude glycerol to 1,3-propanediol and to tolerate high product concentrations. Appl Microbiol Biotechnol 93 (3): 1049-1056

Tagungsbeiträge

Ringel AK, Mildner E, Willke T, Vorlop KD. Fermentative Herstellung von 1,3-Propandiol aus Glycerin. (Vortrag) ProcessNet-Jahrestagung und 27. Jahrestagung der Biotechnologen, Mannheim (2009)

Mildner E, Ringel AK, Böttcher D, Ast C, Willke T, Vorlop KD. Kostenreduktion der mikrobiellen 1,3-Propandiolbildung durch Medienoptimierung. (Poster) ProcessNet-Jahrestagung und 28. Jahrestagung der Biotechnologen, Aachen (2010)

Ringel AK, Mildner E, Willke T, Böttcher D, Schubert M, Vorlop KD. An improved screening method for microorganisms able to convert crude glycerol to 1,3-propanediol and to tolerate high product concentrations. (Poster) 14th International Biotechnology Symposium and Exhibition, Rimini (2010)

Mildner E, Ringel AK, Willke T, Vorlop KD. Identification of cost drivers and subsequent economic optimization of 1,3-propanediol production. (Poster) 14th International Biotechnology Symposium and Exhibition, Rimini (2010)

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Klaus-Dieter Vorlop für die Überlassung des interessanten Themas und das mir dabei entgegengebrachte Vertrauen. Seine fortwährende Diskussionsbereitschaft, sein stetes Interesse an der Arbeit, und seine vielen hilfreichen Anregungen haben wesentlich zu dem Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Siegmund Lang danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens sowie Frau Prof. Dr. Christel Müller-Goyman für ihr Mitwirken in der Prüfungskommission.

Besonders möchte ich mich bei Herrn Dr. Thomas Willke bedanken, der mich mit zahlreichen Diskussionen sowie mit vielfältigen Anregungen und Ideen unterstützt hat.

Weiterhin bedanke ich mich ganz herzlich bei Frau Diana Hortig für ihre exzellente Mitarbeit im Labor.

Ich danke allen Mitarbeitern des Institutes für Agrartechnologie des Johann Heinrich von Thünen-Instituts Braunschweig für das überdurchschnittlich nette Arbeitsklima, die vielseitigen Hilfestellungen, für die Diskussion der Ergebnisse und für die Motivation während der gesamten Arbeit. Insbesondere bedanke ich mich bei Frau Dipl.-Biotechnol. Anne Katrin Ringel, Frau Diana Hortig, Frau Dipl.-Biotechnol. Susann Baumert, Herrn Dipl.-Biol. Hendrik Krauter und Frau Dipl.-Biotechnol. Katrin Riedmann. Frau Cordula Ast danke ich für die tatkräftige Unterstützung im Rahmen der Durchführung ihrer Bachelorarbeit und Martina Heine sowie Frau Dipl.-Chemikerin Katharina Heidkamp für die Durchführung der ICP- und Kjeldahl-Messungen.

Des Weiteren danke ich Herrn PD Dr. Udo Rau und Wolfgang Graßl vom Institut für Biochemie und Biotechnologie der TU-Braunschweig für die Bereitstellung des 200 L-Fermenters und die Assistenz während der Fermentation. Ebenso bedanke ich mich bei Dr. Andreas Berk vom Institut für Tierernährung des Friedrich Löffler Institutes für die Bereitstellung einiger Hefeextraktersatzstoffe.

Dem BMBF danke ich für die finanzielle Unterstützung des Projektes (IG-Biotech 0315026E).

Ein besonders großes Dankeschön an Frau Dr. Andrea Wilkens und Herrn Dr. Tillman Greis für ihre Hilfsbereitschaft und für die sorgfältige Durchsicht meiner schriftlichen Arbeit.

Ganz besonders möchte ich meiner Familie für ihre große Unterstützung während der gesamten Arbeit danken.

Schließlich möchte ich mich bei meiner Frau, Dr. Claudia Wilkens, für ihre Unterstützung, ihr Verständnis und die unendliche Geduld während der gesamten Arbeit und besonderes während der Endphase des Zusammenschreibens bedanken.

Zusammenfassung

Die Nachfrage nach Produkten auf Basis nachwachsender Rohstoffe wächst kontinuierlich und mit ihr die Bedeutung der Industriellen Biotechnologie. Das chemisch interessante Intermediat 1,3-Propandiol (1,3-PD) kann mittels mikrobieller Konversion aus Glycerin hergestellt werden. In Folge seiner Bifunktionalität, durch die zwei beinhalteten Hydroxygruppen, liegt der Hauptanwendungsbereich im Einsatz als Monomer für Polymerisationsreaktionen. Um mit konventionellen chemischen Verfahren konkurrieren zu können, müssen die Kosten des biotechnologischen Prozesses verringert werden. In dieser Arbeit sollte daher die Biokonversion von Glycerin zu 1,3-PD im Hinblick auf eine Kostenreduktion optimiert werden.

Im Anschluss an ein Screening nach natürlichen 1,3-PD-Produzenten [Ringel 2012] wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei erfolgversprechende Stämme ausgewählt und näher untersucht. *Clostridium butyricum* AKR 102a zeigte dabei die höchste Eignung als potenzieller Produktionsstamm. Bei Nutzung von Pharmaglycerin konnte mit AKR 102a in Fed-Batch Fermentationen eine maximale 1,3-PD-Konzentration von $93,7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ erreicht werden. Diese gehört zusammen mit der Produktivität von $3,3 \text{ g}_{1,3\text{-PD}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ zu den höchsten bisher für natürliche Produzenten publizierten Werten. Zur Reduzierung der Prozesskosten kamen Rohglycerine aus der Biodieselproduktion zum Einsatz. Da Inhaltstoffe der Rohglycerine, wie z. B. Fettsäuren und Salze, das mikrobiologische Wachstum hemmen, wurden zwei Strategien zur Prozessoptimierung verfolgt. Neben einer Vorbehandlung des Rohglycerins stand eine Anpassung der Prozessführung an die hohen Salzgehalte im Fokus. Die hierdurch erreichte Konzentration von $76,2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 1,3-PD und die Produktivität von $2,3 \text{ g}_{1,3\text{-PD}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ gehören zu den höchsten bisher publizierten Werten für die Nutzung von Rohglycerin. Weiterhin gelang ein erfolgreiches Scale-up der Rohglycerinfermentation in den 200 L-Maßstab.

Als zweiter Kosteneinsparungspunkt wurde die Substitution des Hefeextrakts durch ein breites Spektrum komplexer Rohstoffe aus Landwirtschaft bzw. Tierernährung untersucht. Hierbei konnten unter anderem durch Einsatz von Fischmehl, Sojaproteinkonzentrat oder Maisquellwasser mit Pharmaglycerin Konzentrationen von bis zu $78 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 1,3-PD erzielt werden. Unter Berücksichtigung ökonomischer Gesichtspunkte wurde Maisquellwasser auf Grund des günstigsten Einkaufspreises für eine kombinierte Fermentation mit Rohglycerin ausgewählt. Die dabei erzielten $66 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 1,3-PD stellen einen sehr guten Ausgangspunkt für weitere Prozessoptimierungen dar.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Zielsetzung	1
2	Theoretische Grundlagen	3
2.1	1,3-Propandiol	3
2.2	Anwendungsmöglichkeiten von 1,3-PD	4
2.3	Herstellungsverfahren von 1,3-PD	5
2.3.1	Chemische Herstellungsverfahren	5
2.3.2	Biotechnologische Herstellungsverfahren	6
2.3.3	Wirtschaftlichkeit	11
2.4	Stoffwechsel der 1,3-PD Produktion	13
2.5	Glycerin	16
2.5.1	Anwendungsmöglichkeiten von Glycerin	16
2.5.2	Glycerinquellen	18
2.5.3	Verwertbarkeit der Rohglycerine	22
2.5.4	Aufarbeitung der Rohglycerine	23
2.6	Substrat- und Produkthemmung	24
2.7	Hefeextraktersatzstoffe	25
3	Material und Methoden	27
3.1	Verwendete Mikroorganismen	27
3.2	Chemikalien, Medien und Lösungen	27
3.2.1	Mineralsalzmedium	27
3.2.2	Spurenelementelösung zu DSMZ-Medium 144 (SL)	30
3.2.3	Vitaminlösung zu DSMZ-Medium 141 (VL)	31
3.2.4	Aminosäurelösung (AS)	31
3.2.5	Glycerin	32
3.2.6	Cysteinlösung	33
3.2.7	Hefeextraktersatzstoffe	34
3.2.8	Rohglycerinaufbereitung	36
3.2.9	Feedlösungen	37
3.3	Analytik	37
3.3.1	Bestimmung der optischen Dichte (OD_{605})	37

3.3.2	Mikroskopie	38
3.3.3	Bestimmung der Biotrockenmasse (BTM)	38
3.3.4	HPLC	39
3.3.5	ICP	40
3.3.6	Stickstoffbestimmung	41
3.4	Anaerobe Medien	41
3.4.1	Herstellung	41
3.4.2	Anaerobisierungsanlage	42
3.5	Kulturen	42
3.5.1	Kryokulturen	42
3.5.2	Arbeitskulturen	43
3.6	Versuchsmaßstäbe	43
3.6.1	96-Well-Mikrotitermaßstab	43
3.6.2	Vialmaßstab	47
3.6.3	1 L-Doppel-Fermentersystem	48
3.6.3.1	Aufbau	48
3.6.3.2	Computersteuerung bzw. -überwachung	53
3.6.3.3	Vorbereitung	54
3.6.3.4	Durchführung der Fermentationen	55
3.6.3.5	Abbruch	55
3.6.4	0,5 L-Fermentation	55
3.6.4.1	Aufbau	55
3.6.5	10 L-Fermentation	57
3.6.5.1	Aufbau	57
3.6.5.2	Vorbereitungen	59
3.6.5.3	Durchführung der Fermentationen	60
3.6.5.4	Abbruch	60
3.6.6	200 L-Fermentation	61
3.6.6.1	Aufbau	61
3.6.6.2	Vorbereitungen	62
3.6.6.3	Durchführung der Fermentationen	62
4	Ergebnisse und Diskussion	65
4.1	Stammauswahl nach konventionellem Screening (Screening 1)	65
4.2	Optimierung der Kultivierungsbedingungen (AKR 17a)	67
4.2.1	Startkonzentration von Hefeextrakt	67
4.2.2	Startkonzentration von Glycerin	68
4.2.3	Pharmaglycerinfermentation im 1 L-Maßstab	69

4.3	Scale-up in den 10 L-Maßstab (AKR 17a).....	72
4.4	Einfluss von Rohglycerin (AKR 17a)	73
4.4.1	Vergleich verschiedener Rohglycerinqualitäten	73
4.4.2	Scale-up der Rohglycerinfermentation in den 10 L-Maßstab	75
4.5	Zusammenfassung der Ergebnisse mit AKR 17a.....	77
4.6	Stammauswahl nach optimiertem Screening (Screening 2).....	77
4.7	Optimierung der Kultivierungsbedingungen (AKR 102a).....	79
4.7.1	Startkonzentration von Hefeextrakt	79
4.7.2	Startkonzentration von Glycerin	80
4.7.3	Temperatur	82
4.7.3.1	Einfluss der Temperatur ohne Vorlage von 1,3-Propandiol	82
4.7.3.2	Einfluss der Temperatur mit Vorlage von 1,3-Propandiol.....	83
4.7.4	Pharmaglycerinfermentation im 1 L-Maßstab	85
4.8	Einfluss einer Hefeextraktreduktion (AKR 102a).....	87
4.9	Einfluss von Rohglycerin (AKR 102a)	90
4.9.1	Vorbehandlung der Rohglycerine	91
4.9.2	Fermentation von mit Hydrotalcit vorbehandeltem Rohglycerin K602	94
4.9.3	Vergleich vorbehandelter Rohglycerine (K501 & K602).....	96
4.9.4	Hemmung durch NaCl	99
4.9.5	Optimierte Rohglycerinfermentation	101
4.9.6	Scale-up in den 200 L-Maßstab	105
4.10	Hefeextraktersatzstoffe (AKR 102a).....	108
4.10.1	Ersatz durch definierte Komponenten.....	108
4.10.1.1	96-Well-Mikrotitermaßstab	108
4.10.1.2	Fed-Batch Fermentation.....	109
4.10.2	Hefeextraktersatz durch komplexe Komponenten	111
4.10.2.1	Prozessierte pflanzliche und tierische Materialien.....	111
4.10.2.2	Extraktion sowie saure Hydrolyse von Rapspresskuchen.....	113
4.10.2.3	Verwertbarkeit von HE-Ersatzstoffen im 96-Well-Mikrotitermaßstab	114
4.10.2.4	Verwertbarkeit von HE-Ersatzstoffen im 50 mL-Vialmaßstab	115
4.10.2.5	Voruntersuchung für die 0,5 L-Batch Fermentationen	117
4.10.2.6	Verwertbarkeit von HE-Ersatzstoffen in 0,5 L-Batch Fermentationen	119
4.10.2.7	Fed-Batch Fermentationen mit HE-Ersatzstoffen im 1 L-Maßstab	121
4.11	Fed-Batch Fermentation mit Rohglycerin und HE-Ersatzstoff.....	128
4.12	Zusammenfassung der Ergebnisse mit AKR 102a.....	130
5	Schlussfolgerungen und Ausblick	133
6	Anhang	135

7	Literaturverzeichnis.....	139
----------	----------------------------------	------------

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1:	Chemische Struktur von PTT.....	5
Abbildung 2.2:	Chemische Herstellung von 1,3-PD [nach Steverding 2010 & Hartlep 2006]	6
Abbildung 2.3:	Biokonversion von Glycerin bzw. Glucose zu 1,3-Propandiol.....	7
Abbildung 2.4:	Sensitivitätsanalyse der mikrobiellen 1,3-PD-Produktion [Bock 2004]	12
Abbildung 2.5:	Kostenverteilung der mikrobiellen 1,3-PD-Produktion [Hirschmann et al. 2005]	13
Abbildung 2.6:	Anaerober Glycerinstoffwechsel [Biebl et al. 1999]	15
Abbildung 2.7:	Durchschnittliche weltweite Glycerinnutzung [Stelmachowski 2011].....	17
Abbildung 2.8:	Umesterung von Triglyceriden mit Alkohol [Ma et al. 1999]	18
Abbildung 2.9:	Anlagenfließbild für die Biodiesel-/Glycerinproduktion der Biopetrol Schwarzheide GmbH (Standort Schwarzheide) nach Prozessumstellung auf Salzsäure und Natriummethylat.....	19
Abbildung 2.10:	Globale Biodieselpkapazität für die Jahre 1991-2003 (Biofuels For Transport - An International Perspective, International Energy Agency, 2004).....	20
Abbildung 2.11:	Geschätzte globale Biodieselproduktion für die Jahre 2009-2019 (Agricultural Outlook 2010-2019 - Biofuel Production, OECD/FAO 2011) 21	
Abbildung 3.1:	Fotos von Hefeextrakt und möglichen Ersatzstoffen.....	35
Abbildung 3.2:	Beispielhafte HPLC-Chromatogramme von 1,3-PD-haltiger Fermenterbrühe	40
Abbildung 3.3:	Foto und Schema Anaerobisierungsanlage	42
Abbildung 3.4:	Herstellung und Überimpfung der Arbeitskulttur	43
Abbildung 3.5:	Beprobungsschema für einen Versuch im 96-Well-Mikrotitermaßstab und externen Plattenphotometer	45
Abbildung 3.6:	Bespielhaftes Beprobungsschema für Vialversuche mit jeweils einem Doppelansatz pro Beprobungszeitpunkt	47
Abbildung 3.7:	Foto und Schema der Probenahmesonde mit Keramikmembran.....	50
Abbildung 3.8:	Foto des Doppelfermentersystems	51
Abbildung 3.9:	Schematische Darstellung des Doppelfermentersystems.....	52
Abbildung 3.10:	Foto des 0,5 L-Fermentersystems	56
Abbildung 3.11:	Schematische Darstellung des 0,5 L-Fermentersystems.....	57
Abbildung 3.12:	10 L-Fermentersystem	58

Abbildung 3.13:	Schematische Darstellung des 10 L-Fermentersystems.....	59
Abbildung 3.14:	Pilot-Fermenter Typ P.....	61
Abbildung 3.15:	Vereinfachte schematische Darstellung des Pilot-Fermenter Typ P.....	62
Abbildung 4.1:	1,3-PD-Konzentrationen für Fed-Batch Fermentationen der konventionell gescreenten Stämme AKR 12, 17a, 17b, 20 und 29	66
Abbildung 4.2:	Entwicklung OD ₅₅₀ bei Kultivierung von AKR 17a auf PG ²⁵ HE ^X _{Vial} mit verschiedenen Hefeextraktstartkonzentrationen im 96-Well-Mikrotitermaßstab.....	67
Abbildung 4.3:	Entwicklung OD ₅₅₀ bei Kultivierung von AKR 17a auf PG ^X HE ² _{Vial} mit verschiedenen Pharmaglycerinstartkonzentrationen im 96-Well-Mikrotitermaßstab.....	68
Abbildung 4.4:	Fed-Batch Fermentation von AKR 17a mit Pharmaglycerin und Hefeextrakt (HE _{ges} 11,5 g·L ⁻¹) im 1 L-Maßstab	70
Abbildung 4.5:	Nebenprodukte der Fed-Batch Fermentation von AKR 17a mit Pharmaglycerin und Hefeextrakt (HE _{ges} 11,5 g·L ⁻¹) im 1 L-Maßstab	71
Abbildung 4.6:	Scale-up der Fed-Batch Fermentation von AKR 17a mit Pharmaglycerin und Hefeextrakt (HE _{ges} 11,5 g·L ⁻¹) in den 10 L-Maßstab.....	72
Abbildung 4.7:	Vergleich der Pharmaglycerin-Fermentationen mit AKR 17a im 1 bzw. 10 L-Maßstab	73
Abbildung 4.8:	1,3-PD-Konzentrationen für Fed-Batch Fermentationen von AKR 17a mit verschiedenen Rohglycerinqualitäten.....	74
Abbildung 4.9:	Scale-up der Fed-Batch Fermentation von AKR 17a mit Rohglycerin K501 und Hefeextrakt (HE _{ges} 9,5 g·L ⁻¹) in den 10 L-Maßstab.....	75
Abbildung 4.10:	1,3-PD-Konzentrationen für 1 L-Fed-Batch Fermentationen der neu-gescreenten Stämme AKR 91b, 92a, 102a im Vergleich zu AKR 17a und DSM 15410.....	78
Abbildung 4.11:	Verlauf OD ₅₅₀ bei Kultivierung von AKR 102a auf PG ²⁵ HE ^X _{Vial} mit verschiedenen Hefeextraktkonzentrationen im 96-Well-Mikrotitermaßstab....	80
Abbildung 4.12:	Verlauf OD ₅₅₀ bei Kultivierung von AKR 102a auf PG ^X HE ² _{Vial} mit verschiedenen Pharmaglycerinkonzentrationen im 96-Well-Mikrotitermaßstab.....	81
Abbildung 4.13:	Verlauf OD ₆₀₅ bei Kultivierung von AKR 102a mit PG ²⁵ HE ¹ _{Vial} bei verschiedenen Temperaturen im 50 mL-Vial	82
Abbildung 4.14:	Glycerin- (Kreis) und 1,3-PD-Konzentration (Dreieck) bei Kultivierung von AKR 102a mit PG ²⁵ HE ¹ _{Vial} bei verschiedenen Temperaturen im 50 mL-Vial.....	83
Abbildung 4.15:	Verlauf OD ₆₀₅ bei Kultivierung von AKR 102a auf PG ²⁵ HE ¹ _{Vial} und Vorlage von 50 g·L ⁻¹ 1,3-PD bei verschiedenen Temperaturen im 50 mL-Vial.....	84
Abbildung 4.16:	Glycerin- (Kreis) und 1,3-PD-Konzentration (Dreieck) bei Kultivierung von AKR 102a mit PG ²⁵ HE ¹ _{Vial} und Vorlage von 50 g·L ⁻¹ 1,3-PD bei verschiedenen Temperaturen im 50 mL-Vial	84
Abbildung 4.17:	Mikroskopaufnahme (40 fache Vergrößerung) nach 51 h Kultivierung von AKR 102a mit PG ²⁵ HE ¹ _{Vial} und Vorlage von 50 g·L ⁻¹ 1,3-PD bei verschiedenen Temperaturen	85

Abbildung 4.18: Fed-Batch Fermentation von AKR 102a mit Pharmaglycerin und Hefeextrakt ($\text{HE}_{\text{ges}} 11 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) im 1 L-Maßstab	86
Abbildung 4.19: Nebenprodukte der Fed-Batch Fermentation von AKR 102a mit Pharmaglycerin und Hefeextrakt ($\text{HE}_{\text{ges}} 11 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) im 1 L-Maßstab	87
Abbildung 4.20: 1,3-PD-Konzentrationen bei Fed-Batch Kultivierungen von AKR 102a mit Pharmaglycerin und verschiedenen HE-Gesamteinsätzen	89
Abbildung 4.21: Prozentuales Verhältnis von HE-Gesamteinsatz zu erzielter 1,3-Propandiolkonzentration für Pharmaglycerinfermentationen mit AKR 102a	90
Abbildung 4.22: Verlauf OD_{550} bei Kultivierung von AKR 102a auf $\text{RG}_{\text{K602}}^{25} \text{HE}_{\text{Vial}}^2$ mit unterschiedlich vorbehandeltem Rohglycerin K602 im 96-Well-Mikrotitermaßstab	91
Abbildung 4.23: Fed-Batch Fermentation von AKR 102a mit vorbehandeltem Rohglycerin K602 und Hefeextrakt ($\text{HE}_{\text{ges}} 12 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) im 1 L-Maßstab	94
Abbildung 4.24: Nebenprodukte der Fed-Batch Fermentation von AKR 102a mit vorbehandeltem Rohglycerin K602 und Hefeextrakt ($\text{HE}_{\text{ges}} 12 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) im 1 L-Maßstab	95
Abbildung 4.25: Verlauf OD_{550} bei Kultivierung von AKR 102a auf $\text{RG}_X^X \text{HE}_{\text{Vial}}^2$ mit vorbehandeltem Rohglycerin K501 (Scheidetrichter, Hydrotalcit)	97
Abbildung 4.26: Verlauf OD_{550} bei Kultivierung von AKR 102a auf $\text{RG}_X^X \text{HE}_{\text{Vial}}^2$ mit orbehandeltem Rohglycerin K602 (Scheidetrichter, Hydrotalcit)	97
Abbildung 4.27: 1,3-PD-Konzentration bei Kultivierung von AKR 102a mit $\text{PG}^{25} \text{HE}_{\text{vial}}^1$ und unterschiedlichen Chloridgehalten in Form von NaCl	100
Abbildung 4.28: Optimierte Fed-Batch Fermentation von AKR 102a mit vorbehandeltem Rohglycerin K602 und Hefeextrakt ($\text{HE}_{\text{ges}} 10,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) im 1 L-Maßstab ...	102
Abbildung 4.29: Nebenprodukte der optimierten Fed-Batch Kultivierung von AKR 102a mit vorbehandeltem Rohglycerin K602 und Hefeextrakt ($\text{HE}_{\text{ges}} 10,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) im 1 L-Maßstab	103
Abbildung 4.30: Glycerin- (Kreis) und 1,3-PD-Konzentration (Dreieck) für Fed-Batch Kultivierungen von AKR 102a mit vorbehandeltem Rohglycerin K602 und Nutzung verschiedener Laugen für die pH-Wert Korrektur	104
Abbildung 4.31: Fed-Batch Kultivierung von AKR 102a mit vorbehandeltem Rohglycerin K602 (Schwimmschichtabtrennung) und Hefeextrakt ($\text{HE}_{\text{ges}} 3,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) im 200 L-Maßstab	106
Abbildung 4.32: Nebenprodukte der Fed-Batch Kultivierung von AKR 102a mit vorbehandeltem Rohglycerin K602 (Schwimmschichtabtrennung) und Hefeextrakt ($\text{HE}_{\text{ges}} 3,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) im 200 L-Maßstab	106
Abbildung 4.33: Prozentualer Vergleich von Gesamtheefeextrakteinsatz und erreichter 1,3-PD Konzentration für die RG-Fermentationen von AKR 102a im 1 bzw. 200 L-Maßstab	107
Abbildung 4.34: Wachstum von AKR 102 auf $\text{PG}^{25} \text{Vial}$ mit Hefeextrakt, Vitaminlösung (VL) oder Aminosäurelösung (AS) im 96-Well-Mikrotitermaßstab	109
Abbildung 4.35: Verlauf der 1,3-PD-Konzentration bei Fed-Batch Kultivierung von AKR 102 mit PG und Hefeextrakt oder einer Kombination definierter Komponenten	110

Abbildung 4.36:	Verlauf OD ₅₅₀ bei Kultivierung von AKR 102a auf PG ²⁵ _{Vial} mit 2 g·L ⁻¹ Pepton bzw. Fleischextrakt im 96-Well-Mikrotitermaßstab.....	112
Abbildung 4.37:	Verlauf OD ₅₅₀ bei Kultivierung von AKR 102a auf PG ²⁵ _{Vial} mit extrahierten Rapsbestandteilen bzw. sauer hydrolysiertem Rapspresskuchen im 96-Well-Mikrotitermaßstab.....	113
Abbildung 4.38:	Verlauf OD ₅₅₀ bei Kultivierung von AKR 102a mit PG ²⁵ _{Vial} und löslichen Bestandteilen der Substanzen pflanzlichen Ursprungs sowie Glutamin im 96-Well-Mikrotitermaßstab	114
Abbildung 4.39:	Verlauf OD ₅₅₀ bei Kultivierung von AKR 102a mit PG ²⁵ _{Vial} und löslichen Bestandteilen der Substanzen tierischem Ursprungs sowie Protigrain® im 96-Well-Mikrotitermaßstab	115
Abbildung 4.40:	1,3-PD Konzentration bei Kultivierung von AKR 102a mit PG ²⁵ _{Vial} und 1 g·L ⁻¹ verschiedener pflanzlicher Hefeextraktersatzstoffe sowie Glutamin	116
Abbildung 4.41:	1,3-PD Konzentration bei Kultivierung von AKR 102a mit PG ²⁵ _{Vial} und 1 g·L ⁻¹ verschiedener tierischer Hefeextraktersatzstoffe sowie Protigrain®	117
Abbildung 4.42:	Glycerin- (Kreis) und 1,3-PD-Konzentrationen (Dreieck) für Batch Fermentationen von AKR 102a mit Pharmaglycerin und 5 g·L ⁻¹ Hefeextrakt.....	118
Abbildung 4.43:	Batch Fermentationen von AKR 102a mit PG ¹²⁵ und 5 g·L ⁻¹ Hefeextrakt oder 5 g·L ⁻¹ komplexer Ersatzstoffe.....	120
Abbildung 4.44:	Glycerin- (Kreis) und 1,3-PD-Konzentrationen (Dreieck) für Batch bzw. Fed-Batch Fermentationen von AKR 102a mit Pharmaglycerin und Fischmehl.....	122
Abbildung 4.45:	Glycerin- (Kreis) und 1,3-PD-Konzentrationen (Dreieck) für Batch bzw. Fed-Batch Fermentationen von AKR 102a mit Pharmaglycerin und Sojaproteinkonzentrat	124
Abbildung 4.46:	Glycerin- (Kreis) und 1,3-PD-Konzentrationen (Dreieck) für Fed-Batch Fermentationen von AKR 102a mit Pharmaglycerin und SPK sowie SPK mit Hefeextrakt	125
Abbildung 4.47:	Glycerin- (Kreis) und 1,3-PD-Konzentrationen (Dreieck) für Batch bzw. Fed-Batch Fermentationen von AKR 102a mit Pharmaglycerin und Maisquellwasser.....	126
Abbildung 4.48:	Fed-Batch Fermentation von AKR 102a mit vorbehandeltem RG K602 und Maisquellwasser (MQW _{ges} 11 g·L ⁻¹) im 1 L-Maßstab	129
Abbildung 6.1:	Glycerine verschiedener Aufarbeitungsstufen (Biopetrol Schwarzheide GmbH), RG K501, RG technisch, RG geblichen und Pharmaglycerin.....	135
Abbildung 6.2:	Korrelation OD ₆₀₅ zu Biotrockenmasse für AKR 17a und AKR 102a.....	135
Abbildung 6.3:	1,3-Propandiolkonzentration bei Kultivierung von AKR 102a auf PG ²⁵ HE ¹ _{Vial} mit variablen Start-pH Werten.....	136
Abbildung 6.4:	Glycerin- (Kreis) und 1,3-PD-Konzentrationen (Dreieck) für Fed-Batch Fermentationen von AKR 102a mit Pharma- bzw. Rohglycerin und Maisquellwasser.....	136

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1:	Eigenschaften 1,3-Propandiol $\geq 98\%$ (MSDS, Merck KGaA)	3
Tabelle 2.2:	Übersicht über Ergebnisse biotechnologischer 1,3-PD-Produktion aus Glycerin.....	9
Tabelle 2.3:	Eigenschaften Glycerin $\geq 98\%$ (MSDS, Carl-Roth GmbH + Co. KG)	16
Tabelle 3.1:	Standardansatz der verwendeten Kulturmedien.....	28
Tabelle 3.2:	Übersicht der verwendeten Medienbezeichnungen	29
Tabelle 3.3:	Spurenelementelösung zu DSMZ-Medium 144 (5x konzentriert)	30
Tabelle 3.4:	Vitaminlösung zu DSMZ-Medium 141 (10x konzentriert)	31
Tabelle 3.5:	Zusammensetzung der Aminosäurelösung	32
Tabelle 3.6:	Zusammensetzung der verwendeten Rohglycerine (Herstellerangaben).....	33
Tabelle 3.7:	Auflistung der verwendeten Hefeextraktersatzstoffe.....	34
Tabelle 3.8:	Auflistung alternativer Präparate für mikrobiologische Fermentationsmedien	36
Tabelle 3.9:	Für Rohglycerinaufbereitung getestete Substanzen	37
Tabelle 3.10:	Komponenten des eingesetzten HPLC-Systems	39
Tabelle 3.11:	Vor- und Nachteile der Messung außerhalb der Anaerobierbank	45
Tabelle 3.12:	Vor- und Nachteile der Messung innerhalb der Anaerobierbank	46
Tabelle 4.1:	Endkonzentrationen von 1,3-PD und Glycerin sowie Produktivitäten und Ausbeuten für Fed-Batch Fermentationen konventionell gescreenter Stämme	65
Tabelle 4.2:	Konzentrationen von 1,3-PD und Glycerin sowie Produktivitäten und Ausbeuten für Fed-Batch Fermentationen von AKR 17a mit verschiedenen Rohglycerinqualitäten	74
Tabelle 4.3:	Fähigkeit der neu-gescreenten Stämme zum Wachstum mit Vitaminlösung anstatt Hefeextrakt.....	78
Tabelle 4.4:	Endkonzentrationen von 1,3-PD und Pharmaglycerin sowie Produktivitäten und Ausbeuten für Fed-Batch Fermentationen der neu-gescreenten Stämme und DSM 15410.....	78
Tabelle 4.5:	Ergebnisse der Hefeextraktreduktion bei Kultivierung von AKR 102a mit Pharmaglycerin	89
Tabelle 4.6:	Analysewerte vorbehandeltes Rohglycerin K602 (Biopetrol Schwarzheide GmbH)	92
Tabelle 4.7:	GC-Fettsäureanalyse vorbehandeltes Rohglycerin K602 (Biopetrol Schwarzheide GmbH)	93

Tabelle 4.8:	Ergebnisse der Fed-Batch Fermentationen von AKR 102a mit PG oder vorbehandeltem RG K602 und Hefeextrakt	95
Tabelle 4.9:	Maximale Zunahme der optischen Dichte bei Kultivierung von AKR 102a mit vorbehandeltem Rohglycerin K501 bzw. K602	98
Tabelle 4.10:	Elementkonzentrationen für Rohglycerin K501 und K602	99
Tabelle 4.11:	Berechnete Natrium- bzw. Chloridkonzentration zum Fermentationsende bei Fed-Batch Fermentation von Rohglycerin K602	101
Tabelle 4.12:	Ergebnisse der Fed-Batch Kultivierungen von AKR 102a mit vorbehandeltem Rohglycerin K602 und Nutzung verschiedener Laugen für die pH-Wert Korrektur	105
Tabelle 4.13:	Ergebnisse der Fed-Batch Kultivierungen von AKR 102a mit Pharmaglycerin und Hefeextrakt oder definierten Komponenten	111
Tabelle 4.14:	Ergebnisse der Batch Fermentationen von AKR 102a mit verschiedenen Pharmaglycerinkonzentrationen und $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Hefeextrakt.....	119
Tabelle 4.15:	Ergebnisse der Batch Fermentationen von AKR 102a mit PG und $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ HE oder $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ komplexer Ersatzstoffe zum Zeitpunkt des Fermentationsabbruches	121
Tabelle 4.16:	Ergebnisse der Batch bzw. Fed-Batch Fermentationen von AKR 102a mit Pharmaglycerin und Fischmehl (Gesamteinsatz)	123
Tabelle 4.17:	Ergebnisse der Batch bzw. Fed-Batch Fermentationen von AKR 102a mit Pharmaglycerin und Sojaproteinkonzentrat (Gesamteinsatz).....	124
Tabelle 4.18:	Ergebnisse der Batch bzw. Fed-Batch Fermentationen von AKR 102a mit Pharmaglycerin und Maisquellwasser (Gesamteinsatz)	127
Tabelle 4.19:	Ergebnisse der Fed-Batch Fermentationen von AKR 102a mit Rohglycerin und Hefeextrakt bzw. Maisquellwasser (Gesamteinsatz)	130
Tabelle 6.1:	Liste der wichtigsten verwendeten Chemikalien	137
Tabelle 6.2:	Gesamt-Stickstoffgehalt (nach Kjeldahl) und Preis pro Tonne für Hefeextrakt bzw. komplexe Ersatzstoffe (Herstellerauskunft)	138

Definitionen, Symbol- und Abkürzungsverzeichnis

Definitionen

durchschnittliche Produktivität	gebildete Menge an 1,3-Propandiol pro Volumen und Zeit, wobei der gesamte Zeitraum ab Fermentationsstart bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes berücksichtigt wird
maximale Produktivität	maximal gebildete Menge an 1,3-Propandiol pro Volumen und Zeit
Massen-Ausbeute	Masse an gebildetem 1,3-Propandiol [g] bezogen auf die Masse an verbrauchtem Glycerin [g]
molare Ausbeute	auf die Stoffmenge [mol] bezogene Menge an 1,3-Propandiol, die pro verbrauchtem Mol Glycerin gebildet wurde

Symbol	Einheit	Bezeichnung
BTM	$[\text{g} \cdot \text{L}^{-1}]$	Biotrockenmasse
c	$[\text{g} \cdot \text{L}^{-1}]$	Konzentration
M	$[\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}]$	molar
OD	[-]	optische Dichte
Q	$[\text{g}_{1,3\text{-PD}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}]$	volurimetrische Produktivität
T	$[^{\circ}\text{C}]$	Temperatur
v/v	[%]	Volumen pro Volumen
w/v	[%]	Gewicht pro Volumen
w/w	[%]	Gewicht pro Gewicht
Y	$[\text{g}_{1,3\text{-PD}} \cdot \text{g}_{\text{Gly}}^{-1}]$	Massen-Ausbeute
Y	$[\text{mol}_{1,3\text{-PD}} \cdot \text{mol}_{\text{Gly}}^{-1}]$	molare Ausbeute

Abkürzungen	Bezeichnung
1,3-PD	1,3-Propandiol
AS	Aminosäurelösung
ATP	Adenosintriphosphat
BTM	Biotrockenmasse
CAS-Nummer	(<i>Chemical Abstracts Service</i>) Internationale Registrierungsnummer
DSMZ	Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
EU-Nummer	Nummer für Einstufung, Kennzeichnung und Verpackung
FM	Fischmehl
GC	Gaschromatographie
Glc	Glucose
Gly	Glycerin
HE	Hefeextrakt
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. <i>high performance liquid chromatography</i>)
ICP	(<i>Inductively Coupled Plasma</i>)-Emmissions-Spektrometer
Kat.	Katalysator
KP	Kartoffelprotein
LD ₅₀	mittlere letale Dosis
MONG	engl. <i>matter organic non glycerol</i>
MQW	Maisquellwasser
MSDS	Sicherheitsdatenblatt (engl. <i>material data safety sheet</i>)
NADH ₂	Nicotinamid-Dinukleotid
OD	optische Dichte
PG	Pharmaglycerin
pHIC	elektronische pH-Anzeige und -regelung
pHIRC	elektronische pH-Anzeige, -aufzeichnung und -regelung
PET	Polyethylenterephthalat
PTT	Polytrimethylenterephthalat
RG	Rohglycerin
RI	Brechungsindex (engl. <i>refractive index</i>)
RME	Rapsmethylester
RNA	Ribonucleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. <i>rounds per minute</i>)
SL	Spurenelementlösung
SPK	Sojaproteinkonzentrat
TI	elektronische Temperaturanzeige

Abkürzungen**Bezeichnung**

TIC	elektronische Temperaturanzeige und -regelung
TIR	elektronische Temperaturanzeige und -aufzeichnung
UV	ultraviolett
VL	Vitaminlösung
WK	Weizenkleber

Indizes

end	Ende des Beobachtungszeitraumes
ges	gesamt
max	maximal
605	Wellenlänge von 605 nm
550	Wellenlänge von 550 nm

1 Einleitung und Zielsetzung

In Anbetracht endlicher fossiler Ressourcen und deren steigender Preise gewinnt die Produktion von Chemikalien aus nachwachsenden Rohstoffen immer mehr an Bedeutung. Das globale Marktvolumen der durch Industrielle Biotechnologie gewonnenen Chemikalien wird bis 2015 auf mehr als 300 Mrd. Euro ansteigen [Saxena et al. 2009]. Ein interessantes Produkt ist 1,3-Propandiol (1,3-PD), dessen geschätzter jährlicher Bedarf 2008 allein in den USA bei mehr als 50000 Tonnen lag und kontinuierlich steigt [Kraus 2008]. Neben einem breiten Anwendungsspektrum, wie z. B. als Zusatz in Kosmetik, Medizin, Frostschutz, Löse- oder Schmiermitteln [Saxena et al. 2009], liegt der Schwerpunkt jedoch auf dem Einsatz als Monomer für Polymerisationsreaktionen. Durch seine Bifunktionalität kann es beispielsweise bekannte Verbindungen wie Ethylenglycol oder 1,4-Butandiol ersetzen. Das durch die Reaktion von 1,3-PD mit Terephtalsäure entstehende Polytrimethylenterephtalat (PTT) ist bereits kommerziell erhältlich und wird als Sorona[®] (Dupont) oder Corterra[™] (Shell) vertrieben. Die Anwendungsbereiche des PTT reichen dabei von Textilien und Teppichen über Polymerfilme bis hin zu Formteilen [Kurian 2005]. 1,3-Propandiol wurde lange Zeit ausschließlich über chemische Synthese ausgehend von Acrolein (Degussa/DuPont) oder Ethylenoxid (Shell) produziert. Neben der chemischen Synthese gibt es biotechnologische Verfahren zur Produktion von 1,3-PD aus Glucose oder Glycerin. Glycerin kann durch mikrobiologische Fermentation oder chemische Synthese gewonnen werden [daSilva et al. 2009]. Weiterhin fällt es als Nebenprodukt bei der Verseifung von Fetten oder der Umesterung von Pflanzenölen während der Biodieselherstellung an. Pro Tonne Biodiesel entstehen hierbei 100 kg Glycerin, die entweder direkt verwendet oder bis zu Pharmaglycerin aufgearbeitet werden [Yazdani et al. 2007]. Um mit den konventionellen chemischen Herstellungsverfahren wettbewerbsfähig konkurrieren zu können, muss eine Reduzierung der Produktionskosten der Biokonversion von Glycerin zu 1,3-PD erreicht werden. Den Hauptansatzpunkt stellen dabei die Rohmaterialien dar, da ihr Anteil an den Gesamtprozesskosten bei ca. 50 % liegt [Hirschmann et al. 2005]. Eine Kostenreduktion lässt sich im Rahmen des reinen Fermentationsprozesses auf zwei Arten erzielen: einerseits durch die Nutzung von preiswerterem Rohglycerin und andererseits durch die Reduzierung des Anteils

weiterer kostenintensiver Medienbestandteile, wie z. B. Hefeextrakt. Durch die weltweit steigende Produktion biobasierter Treibstoffe wird Rohglycerin künftig in ausreichenden Mengen als Rohstoff zur Verfügung stehen. In Folge der fehlenden kostenintensiven Aufreinigungsschritte ergibt sich dabei gegenüber Pharmaglycerin ein bedeutender Kostenvorteil. Es muss jedoch beachtet werden, dass die Verwertbarkeit des Rohglycerins stark von den potenziell vorliegenden Verunreinigungen wie Methanol, Salz, Schwermetallen oder Fettsäuren abhängt [Petitdemange et al. 1995; Chatzifragkou et al. 2010]. Das Wachstum eines Produktionsstammes sollte daher entweder nur wenig durch diese Verunreinigungen beeinflusst werden, oder es bedarf einer Verbesserung der Rohglycerinqualität durch eine günstige Aufarbeitung bzw. Vorbehandlung.


Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, im Rahmen des Projektes IG-Biotech (0315026E, gefördert durch das BMBF), verschiedene am Institut für Agrartechnologie des Johann Heinrich von Thünen-Instituts (vTI) neu isolierte 1,3-PD-Produzenten auf ihre Prozesstauglichkeit hin zu untersuchen. Mit den vielversprechendsten Stämmen sollten durch den Einsatz optimierter Fermentationsstrategien höchstmögliche 1,3-PD-Konzentrationen, Ausbeuten und Produktivitäten erzielt werden. Aus ökonomischen Erwägungen lag ein Hauptaugenmerk auf der Nutzbarkeit von Rohglycerinen aus der Biodieselproduktion. Ebenso sollte mit Blick auf eine zukünftige industrielle Anwendung des Prozesses ein Scale-up in den 200 L-Maßstab durchgeführt werden. Weiterhin stand eine Verringerung der Medienkosten durch Reduktion des Hefeextraktes bzw. dessen Substitution durch alternative preisgünstige Materialien, z. B. aus der Landwirtschaft oder Tierernährung, im Fokus.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 1,3-Propandiol

Bei 1,3-Propandiol handelt es sich um eine farb- und geruchslose Flüssigkeit, die zur Stoffklasse der zweiwertigen Alkohole, den Diolen, gehört. In Tabelle 2.1 sind die Eigenschaften der organisch-chemischen Verbindung dargestellt.

Tabelle 2.1: Eigenschaften 1,3-Propandiol $\geq 98\%$ (MSDS, Merck KGaA)

Allgemeines	
Strukturformel	
Name	1,3-Propandiol
Synonyme	Trimethylenglycol, 1,3-Propylenglycol
Summenformel	$C_3H_8O_2$
EU-Nummer	207-997-3
CAS-Nummer	504-63-2
Chemische und physikalische Eigenschaften	
Molare Masse	$76,09 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
Löslichkeit	$100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (20 °C)
Dichte	$1,05 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (20 °C)
pH-Wert	4,5 - 7,0 ($100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, H_2O , 20 °C)
Schmelzpunkt	-32 °C
Flammpunkt	140 °C
Siedepunkt	213 - 215 °C
Zündtemperatur	405 °C
Dampfdruck	$< - 0,1 \text{ hPa}$ (20 °C)
Brechungsindex	1,4396 (20 °C, 589 nm)
Toxikologische Eigenschaften	
LD _{50,oral}	LD _{50,Ratte} $15670 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$
LD _{50,dermal}	LD _{50,Kaninchen} $> 20000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$

2.2 Anwendungsmöglichkeiten von 1,3-PD

1,3-Propandiol bietet eine große Anzahl vielseitiger Anwendungsmöglichkeiten. Es wird für die Einführung von Schutzgruppen in Aldehyden und Ketonen verwendet [Steverding 2010]. Weiterhin dient es als Basis für Kühl- bzw. Frostschutzmittel von Motoren und Brennstoffzellen [Eaton et al. 2004]. Im Mörtel trägt es zur Erhöhung des Wasserrückhaltevermögens bei, um eine gleichmäßige Aushärtung zu gewährleisten [Wagner et al. 1980]. Als Zusatz für Tinten auf Wasserbasis führt es zur Reduzierung des Trocknungsverlustes, um das Ausfällen bzw. die Zusammenlagerung fester Partikel, wie z. B. der Farbpigmente, zu verhindern [Katsuko 2010]. Weiterhin wird über die Produktion von Frischhaltemitteln für Schnittblumen, die Produktion von Bioziden zu Desinfektionszwecken oder den Einsatz als Tiernahrungszusatzstoff berichtet [Zeng et al. 2002]. Durch sein geringeres Potenzial für Hautirritationen oder –sensibilisierung, z. B. im Vergleich zu dem bisher weit verbreiteten 1,2-Propandiol, stellt 1,3-Propandiol eine interessante Glycol-Alternative im Bereich der Körperpflege bzw. Kosmetik dar [Belcher et al. 2010]. 1,3-PD biologischer Herkunft wird dort z. B. als Feuchthaltemittel oder Trägerstoff eingesetzt (Zemea[®], http://www.duponttateandlyle.com/products_zemea.php). Weiterhin können 1,3-Propandiol und seine Ester als nicht reizende Lösemittel für die Extraktion oder Verdünnung pflanzlicher oder mariner Substrate sowie Duftstoffkonzentrate bzw. Öle verwendet werden [Joerger et al. 2010].

Die Bifunktionalität durch die zwei beinhalteten Hydroxygruppen erlaubt den Einsatz des 1,3-Propandiols im Rahmen der Polymerherstellung (Polyester und -urethane). Dort kann es andere bekannte bifunktionale Moleküle, wie z. B. Ethylenglykol, Propylenglykol oder 1,4-Butandiol, ersetzen. Neben der Herstellung von Polyurethan-Acrylaten, z. B. als Grundlage für Lacke [Sommer et al. 2010], kann 1,3-Propandiol auch als Bestandteil ungesättigter Polyesterharze für Formteil- bzw. Extrusionsanwendungen [Page et al. 2009] oder als Basis zur Steigerung der Flexibilität und Schlagfestigkeit von Pulverbeschichtungen [Thames et al. 2002] genutzt werden. Ebenso scheint die Herstellung spezieller wässriger Polyurethan-dispersionen für Haarfärbemittel denkbar [Viala et al. 2011]. Die derzeitige Hauptanwendung von 1,3-PD liegt in der Produktion von Polytrimethylenterephthalat (PTT). Dies wird kommerziell als Sorona[®] (DuPont) oder Corterra[™] (Shell) vertrieben. Die Polyester aus 1,3-Propandiol und Terephthalsäure weisen in Folge der Art ihrer molekularen Bindung eine starke Zickzackstruktur auf (siehe Abbildung 2.1).

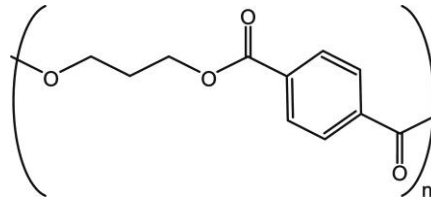


Abbildung 2.1: Chemische Struktur von PTT

Durch diese sprungfederartige Struktur ergibt sich eine hohe Rückstellfähigkeit und Belastbarkeit. Gepaart mit weiteren Eigenschaften, wie z. B. hoher UV-Beständigkeit und Schmutzfestigkeit [Kurian 2005], ergibt sich ein breites Anwendungsspektrum für PTT-Fasern, wie z. B. Textilien, Teppiche oder Polsterwaren. Da die Produktionsschritte von Polyethylenterephthalat (PET) und PTT vergleichbar sind, lassen sich bestehende PET-Produktionsstätten relativ preisgünstig auf die Produktion von PTT umrüsten [Maervoet et al. 2011].

2.3 Herstellungsverfahren von 1,3-PD

1,3-Propandiol kann sowohl über den reinen chemischen als auch biotechnologischen Weg synthetisiert werden.

2.3.1 Chemische Herstellungsverfahren

Für die chemische Synthese von 1,3-Propandiol werden zwei primäre Varianten angewendet. Das von Degussa entwickelte und später an DuPont veräußerte Verfahren geht von Acrolein aus, welches zunächst zu 3-Hydroxypropionaldehyd hydratisiert wird. Anschließend erfolgt die katalytische Hydrierung zu 1,3-Propandiol (siehe Abbildung 2.2). Bisher wurde das Acrolein durch die Oxidation von Propylen gewonnen, jedoch scheint auch die Synthese ausgehend vom Glycerin möglich [Kraus 2008]. Die erzielbaren Ausbeuten sind von den Prozessbedingungen und den verwendeten Katalysatoren abhängig. Das Shell-Verfahren (siehe Abbildung 2.2) basiert auf der Hydroformulierung von Ethylenoxid mit einer anschließenden Hydrierung des entstandenen 3-Hydroxypropionaldehyds zu 1,3-Propandiol [Steverding 2010].

Nachteile der chemischen Verfahren sind neben Verunreinigungen des synthetisierten 1,3-Propandiols [Kurian 2005] sowohl toxische Intermediate und hohe Ausrüstungskosten [Liu et al. 2010], als auch die starke Abhängigkeit von fossilen Rohstoffen.

Degussa/DuPont:

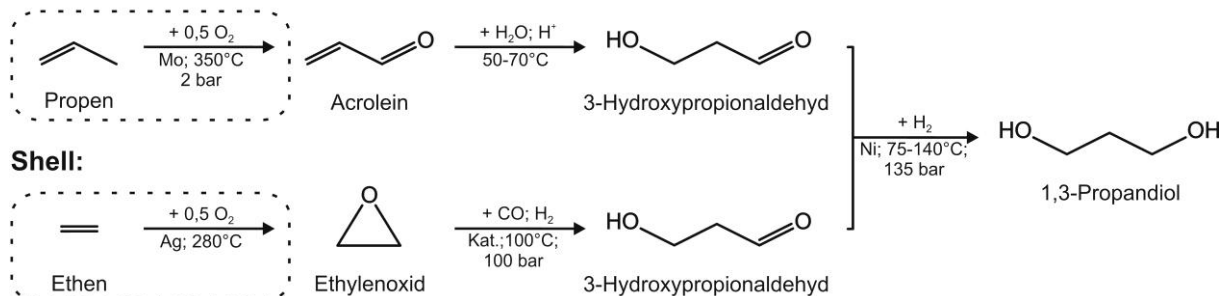


Abbildung 2.2: Chemische Herstellung von 1,3-PD [nach Steverding 2010 und Hartlep 2006]

Neben den etablierten chemischen Verfahren gibt es diverse experimentelle Ansätze zur Gewinnung von 1,3-Propandiol. Beispielfähig hierfür ist die selektive Hydrogenolyse von Glycerin zu 1,3-Propandiol [Gong et al. 2010] oder die selektive Reduktion von 1,2-Propandiol [Kraus 2008].

2.3.2 Biotechnologische Herstellungsverfahren

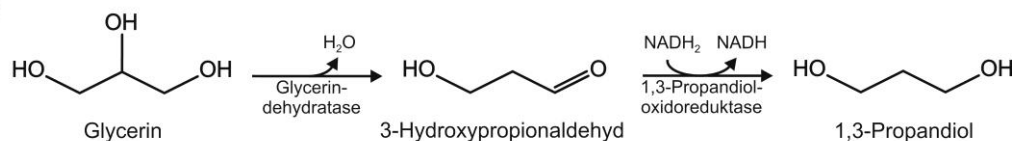
Die mikrobiologische Produktion von 1,3-Propandiol ist seit langem bekannt. Bereits vor 130 Jahren wurde es als auftretendes Reaktionsprodukt einer fermentativen Umsetzung von Glycerin beschrieben [Freund 1881]. Eine große Bandbreite natürlich vorkommender Mikroorganismen ist in der Lage Glycerin über 3-Hydroxypropionaldehyd zu 1,3-Propandiol umzusetzen (siehe Abbildung 2.3). Für Enterobacteriaceae, wie z. B. *Klebsiella pneumoniae* [Homann et al. 1990], *Klebsiella oxytoca* [Yang et al. 2007], *Citrobacter freundii* [Boenigk et al. 1993] und *Enterobacter agglomerans* [Barbirato et al. 1998]; Clostridiaceae, wie z. B. *Clostridium butyricum* [Biebl et al. 1992], *Clostridium diolis* [Biebl et al. 2002], *Clostridium beijerinckii* und *Clostridium pasteurianum* [Willke et al. 2008] oder Lactobacillaceae, wie z. B. *Lactobacillus brevis* [Schuetz et al. 1984], wurde die Bildung von 1,3-Propandiol unter anaeroben Bedingungen nachgewiesen. Stämme von *Klebsiella pneumoniae* sind dazu befähigt 1,3-Propandiol unter aeroben bzw. mikroaeroben Bedingungen zu produzieren [Cheng et al. 2004; Liu et al. 2007].

Bei der Bewertung der Eignung natürlicher Mikroorganismen als potenzielle industrielle 1,3-PD-Produzenten sind neben hohen Ausbeuten und 1,3-PD-Konzentrationen verschiedene

Gesichtspunkte zu beachten. Clostridiaceae sind meist als nicht pathogene Organismen eingestuft (für *C. butyricum* bei Nachweis fehlender Toxinbildung) jedoch als strikt anaerobe Mikroorganismen schwieriger in der Handhabung. *Klebsiella pneumoniae* wird als pathogen eingestuft, was die Sicherheitsanforderungen an eine Produktionsstätte deutlich erhöht. Durch die Eigenschaft fakultativ anaerob wachsen zu können, wird jedoch die Handhabung erleichtert [Willke et al. 2008].

Neben der Verwendung natürlicher Produzenten besteht die Möglichkeit durch Mutation bzw. genetische Modifizierung eine Verbesserung der bereits vorhandenen Stamm- bzw. Produktionseigenschaften (z. B. Resistenz gegenüber hohen Substrat- bzw. Produktkonzentrationen, Produktivität usw.) [Otte et al. 2009] oder Minimierung von Nebenprodukten [Xu et al. 2009; Kim et al. 2010; Soucaille 2010] zu erreichen. Für die industrielle Produktion von 1,3-PD aus Rohglycerin mittels genetisch veränderter Organismen plant METabolic EXplorer eine Produktionsstätte in Malaysia mit einer Jahreskapazität von 50000 Tonnen (www.metabolic-explorer.com, 2010).

Biokonversion:



DuPont/Tate&Lyle:

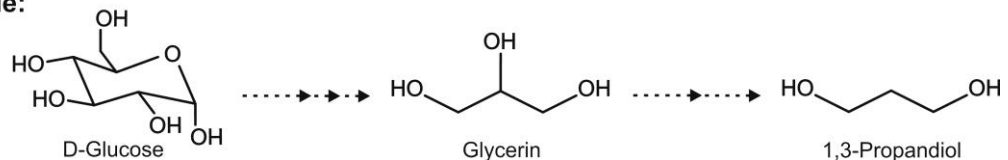


Abbildung 2.3: Biokonversion von Glycerin bzw. Glucose zu 1,3-Propandiol

Zusätzlich zur Modifizierung vorhandener Stoffwechselwege kann „genetic engineering“ auch anderweitig eingesetzt werden. Durch die Einbringung entsprechender Gensequenzen können Mikroorganismen zur Bildung von 1,3-Propandiol befähigt werden, die normalerweise nicht dazu in der Lage sind [Laffend et al. 1997]. DuPont hat in Zusammenarbeit mit Genencor einen genetisch veränderten *Escherichia coli* Stamm entwickelt, um ausgehend von Zucker aus Maisstärke 1,3-Propandiol zu produzieren [Nakamura et al. 2003] (siehe Abbildung 2.3). Dieses seit 2007 zusammen mit Tate&Lyle in einer Anlage in Loudon, Tennessee (USA) produzierte 1,3-Propandiol wird kommerziell vertrieben (Susterra®). Die Jahresproduktion liegt nach einer ersten Kapazitätserhöhung derzeit bei ca. 60000 Tonnen

(www.duponttateandlye.com, Mai 2010). Der Prozess zeichnet sich durch einen im Vergleich zur chemischen Synthese deutlich niedrigeren Energieverbrauch und geringere Verunreinigungen aus [Kurian 2005]. Nachteilig im Vergleich zur direkten Biokonversion von Glycerin ist jedoch die geringere Ausbeute.

Neben dem von DuPont gewählten Ansatz stellt die durch verschiedene Mikroorganismen getrennt voneinander durchgeführte Glycerin- und 1,3-PD-Bildung eine weitere Möglichkeit dar. Dies kann entweder mit Mischkulturen in einer Stufe oder Reinkulturen in einem Zweistufenprozess durchgeführt werden. Mendes [Mendes et al. 2011] berichtet beispielsweise über den Einsatz eines genetisch veränderten *Saccharomyces cerevisiae* Stammes um in einem ersten Schritt Glucose- oder Melasse zu Glycerin umzusetzen. In einem zweiten Schritt erfolgt dann die Konversion des produzierten Glycerins zu 1,3-PD durch einen genetisch veränderten *Clostridium acetobutylicum* Stamm.

Die biotechnologische Produktion von 1,3-PD aus nachwachsenden Rohstoffen bietet einige nennenswerte Vorteile gegenüber den konventionellen chemischen Herstellungsverfahren auf Basis fossiler Rohstoffe. Neben der Vermeidung toxischer Intermediate werden sowohl der Energieverbrauch als auch die Emission von Treibhausgasen verringert [Liu et al. 2010].

Die biotechnologische Produktion von 1,3-PD lässt sich auf verschiedene Arten realisieren. Im Batch Verfahren erfolgt die Vorlage aller für das Wachstum benötigten Nährstoffe und des Substrates. Nach Fermentationsbeginn erfolgen lediglich eine Begasung, pH-Korrektur und die Zugabe von Antischaummitteln. Dem geringen apparativen Aufwand und der einfachen Prozessführung steht eine Begrenzung der maximal erreichbaren Produktkonzentration durch die Substratvorlage (Glycerin) bzw. der Nährstofflimitierung entgegen. Dabei muss auch beachtet werden, dass mit einer erhöhten Substratkonzentration in der Vorlage die wachstumsinhibierende Wirkung des Glycerins steigt und zu einer Verlängerung der Fermentationsdauer führen kann. Durch die technisch aufwändigere Fed-Batch Fahrweise kann durch kontinuierliche Nachführung von Substrat und Nährstoffen mit einer geringeren Glycerinkonzentration gearbeitet werden. Es ist dabei möglich die Fütterungsraten an den vorliegenden Prozessverlauf anzupassen, z. B. über eine per Online-HPLC gesteuerte Zugabe oder die Kopplung an die Laugentitration. Die dritte Variante stellt die kontinuierliche Kultur dar. Durch die konstante Zu- und Abführung von Medium bzw. Kulturbrühe können nach Erreichen eines Gleichgewichtszustandes sehr hohe Produktivitäten erzielt werden. Wachstumsinhibierende Nebenprodukte werden dabei fortlaufend aus dem System entfernt. Tabelle 2.2 gibt einen Auszug über publizierte Ergebnisse zur mikrobiellen 1,3-PD-Produktion unterteilt nach dem verwendeten Fermentationsmodus.

Tabelle 2.2: Übersicht über Ergebnisse biotechnologischer 1,3-PD-Produktion aus Glycerin

	Spezies	Stamm	Substrat	1,3-PD [g·L ⁻¹]	Y _{1,3-PD/Gly} [g·g ⁻¹]	Q _{1,3-PD} [g·L ⁻¹ ·h ⁻¹]	Referenz
Fed-Batch	<i>Clostridium</i> sp.	IK123	PG	103,2	0,59	1,90	Bock 2004
	<i>Clostridium</i> sp.	IK124 »	PG	87,7	0,54	1,90	Hirschmann et al. 2005
			RG	80,1	0,56	1,80	
	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	DG1 (pSPD5) [#]	PG	83,9	0,54	1,8	González-Pajuelo et al. 2005
	<i>Clostridium butyricum</i>	n.b.	Gly	86,6	n.b.	1,88	Hartlep et al. 2002
	<i>Clostridium butyricum</i>	DSM 5431 »	PG	42,0	0,51	2,14	Asad-ur-Rehman et al. 2008
			RG	45,0	0,49	2,00	
	<i>Clostridium butyricum</i>	DSM 5431	PG	58,0	0,56	2,70	Günzel et al. 1991
	<i>Clostridium butyricum</i>	DSM 5431 mutant 2/2	PG	47,6	0,51	2,40	Reimann et al. 1996
			PG	70,4	0,56	1,40	
	<i>Clostridium butyricum</i>	E5 »	PG	65,6	0,54	1,37	Petitdemange et al. 1995
			RG	58,4	0,54	1,22	
	<i>Clostridium butyricum</i>	VPI 1718	RG	67,9	0,55	0,78	Chatzifragkou et al. 2011
	<i>Clostridium butyricum</i>	VPI 3266	PG	65,0	0,57	1,21	Saint-Amans et al. 1994
			PG	65,0	0,57	1,21	
	<i>Clostridium diolis</i>	DSM 15410 GSHM 2 [‡]	PG	78,5	0,53	2,82	Otte et al. 2009
			RG	53,7	0,40	1,92	
	<i>Clostridium diolis</i>	DSM 15410 GSHM 4 [‡]	PG	84,8	0,52	2,75	Otte et al. 2009

<i>Escherichia coli</i>	K12 [#]	Glucose	135,0	0,51	3,50	Nakamura et al. 2003
<i>Escherichia coli</i>	K12 ER2925 [#]	PG *	104,4	0,90	2,61	Tang et al. 2009
<i>Klebsiella oxytoca</i>	LDH3 [#]	PG ^{m/c}	83,6	0,51	1,40	Yang et al. 2007
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	n.b.	Gly	83,5	n.b.	1,47	Hartlep et al. 2002
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	[#]	RG ^{m/c}	76,9	0,47	2,56	Wu et al. 2010
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	DSM 4799	RG	80,2	0,45	1,16	Jun et al. 2010

^a aerob; ^m mikro-aerob; ⁿ anaerob; ^c Cosubstrat; ⁱ immobilisiert; * zweistufig; [#] GVO; [‡] Mutant; n.b. – nicht bekannt

	Spezies	Stamm	Substrat	1,3-PD [g·L ⁻¹]	Y _{1,3-PD/Gly} [g·g ⁻¹]	Q _{1,3-PD} [g·L ⁻¹ ·h ⁻¹]	Referenz
Fed-Batch	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	DSM 2026 »	PG ⁿ » ^m	56,0 59,5	0,45 0,45	0,80 1,57	Chen et al. 2003
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	DSM 2026 »	PG RG	61,9 53,0	0,40 0,39	2,00 1,70	Mu et al. 2006
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	DSM 2026 [‡] »	PG ⁿ » ^m	81,0 77,0	0,53 0,51	3,00 2,70	Liu et al. 2007
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	HR526 LDH526 [#]	PG ^a » ^a	95,4 102,1	0,40 0,43	2,00 2,10	Xu et al. 2009
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Kp-M2 [‡]	PG ^m	76,7	0,48	2,13	Dong et al. 2010
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	M5a1 »	PG ^a » ^{n/a}	53,6 70,0	0,36 0,42	0,67 1,00	Cheng et al. 2004
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	M5a1	RG	58,8	0,44	0,92	Cheng et al. 2007
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	TUAC01	PG	66,3	n.b.	1,00	Hao et al. 2008
Batch	<i>Citrobacter freundii</i>	ATCC 8090	PG	31,2	0,45	0,35	Barbirato et al. 1998
	<i>Clostridium butyricum</i>	CNCM 1211	RG	63,4	0,57	1,85	Barbirato et al. 1998
	<i>Clostridium butyricum</i>	CNCM 1211 »	PG RG	67,0 65,4	0,52 0,55	n.b. n.b.	Himmi et al. 1999
	<i>Clostridium butyricum</i>	DSM 5431	PG	56,0	0,51	1,90	Biebl et al. 1992
	<i>Clostridium butyricum</i>	F2b	RG	47,1	0,53	n.b.	Papanikolaou et al. 2008
	<i>Clostridium butyricum</i>	VPI 3266	PG	35,0	0,54	0,72	Saint-Amans et al. 1994
	<i>Enterobacter agglomerans</i>	CNCM 1210	PG	33,0	0,57	0,94	Barbirato et al. 1998
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 15380	Gly	57,7	0,46	2,40	Tag 1990
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 25955	PG	31,8	0,45	0,58	Barbirato et al. 1998
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	DSM 2026	PG	61,0	0,51	1,70	Homann et al. 1990

^a aerob; ^m mikro-aerob; ⁿ anaerob; ^c Cosubstrat; ⁱ immobilisiert; ^{*} zweistufig; [#] GVO; [‡] Mutant; n.b. – nicht bekannt

	Spezies	Stamm	Substrat	1,3-PD [g·L ⁻¹]	Y _{1,3-PD/Glv} [g·g ⁻¹]	Q _{1,3-PD} [g·L ⁻¹ ·h ⁻¹]	Referenz
Konti	<i>Citrobacter freundii</i>	DSM 30040	PG *	41,4	0,51	1,38	Boenigk et al. 1993
	<i>Citrobacter freundii</i>	DSM 30040	PG ⁱ	18,9	0,39	5,70	Pflugmacher et al. 1994
	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	DG1 (pSPD5) [#]	PG	60,0	0,53	3,00	González-Pajuelo et al. 2005
	<i>Clostridium butylicum</i>	B593	PG	18,8	0,50	n.b.	Forsberg 1987
	<i>Clostridium butyricum</i>	F2b	RG	48,1	0,55	(1,00)	Papanikolaou et al. 2000
	<i>Clostridium butyricum</i>	F2b	RG *	43,5	0,49	1,33	Papanikolaou et al. 2008
	<i>Clostridium butyricum</i>	VPI 3266	RG	31,5	0,50	3,15	González-Pajuelo et al. 2004
	<i>Clostridium butyricum</i>	VPI 3266	PG	30,0	0,56	10,30	González-Pajuelo et al. 2005b
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	DSM 2026	PG	48,5	(0,50)	4,90	Menzel et al. 1997

^a aerob; ^m mikro-aerob; ⁿ anaerob; ^c Cosubstrat; ⁱ immobilisiert; * zweistufig; [#] GVO; [‡] Mutant; n.b. - nicht bekannt

2.3.3 Wirtschaftlichkeit

Die Auswirkungen von Veränderungen einzelner Faktoren auf die Wirtschaftlichkeit des Prozesses sind sehr unterschiedlich. Die in Abbildung 2.4 dargestellte Sensitivitätsanalyse [Bock 2004] bezieht sich auf die Fed-Batch Fermentation in einer Anlage mit einer Jahreskapazität von 5000 t (Rohglycerinpreis: 500 €·t⁻¹, 1,3-PD-Konzentration: 85 g·L⁻¹, Ausbeute: 0,5 g_{1,3-PD}·g_{Gly}⁻¹, Fermentationsdauer: 48 h, Dampfpriess 24 €·MWh⁻¹, Personalbesatz: 8 Arbeitskräfte).

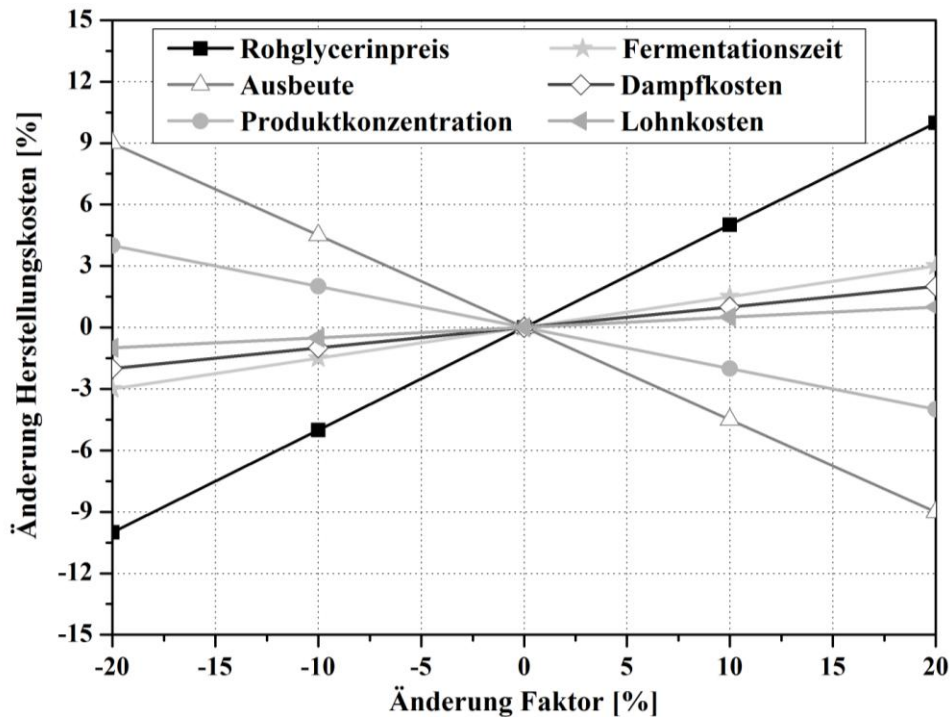


Abbildung 2.4: Sensitivitätsanalyse der mikrobiellen 1,3-PD-Produktion [Bock 2004]

Es wird deutlich, dass der Rohglycerinpreis und die Ausbeute den mit Abstand höchsten Einfluss auf die Gesamtprozesskosten haben. Eine Erhöhung der Ausbeute resultiert bei gleichbleibender Produktkonzentration beispielsweise in einem verringerten Substratbedarf. Veränderungen in der erreichten 1,3-PD-Konzentration und der Fermentationsdauer haben eine deutlich geringere Auswirkung. Eine erhöhte Fermentationsdauer führt dabei zu steigenden Energiekosten (z. B. Temperierung, Rühren) und erhöht die Anzahl der benötigten Fermenter für eine kontinuierliche Produktion. Eine niedrigere Konzentration an 1,3-PD wirkt sich beispielsweise auf die Produktaufarbeitung aus, die dadurch kosten- und zeitintensiver wird. Die Veränderungen der Personal- oder Dampfkosten haben nur relativ geringe Auswirkungen auf die Prozesskosten.

Aus der in Abbildung 2.5 dargestellten Kostenverteilung für eine 1,3-PD-Produktion (Fed-Batch, Kapazität: 5000 t pro Jahr, Glycerinpreis: $600 \text{ €} \cdot \text{t}^{-1}$, Hefeextrakt: $> 3500 \text{ €} \cdot \text{t}^{-1}$) kann man erkennen, dass die Rohstoffkosten 50 % der Gesamtprozesskosten stellen [Hirschmann et al. 2005]. Sie gehören zusammen mit den Vorkulturrkosten zu den im Fermentationsprozess direkt beeinflussbaren Faktoren. Die Kosten für die Vorkulturen ließen sich durch

Verringerung des Inokulums, Immobilisate oder mittels Repeated-Fed-Batch Fermentationen senken.

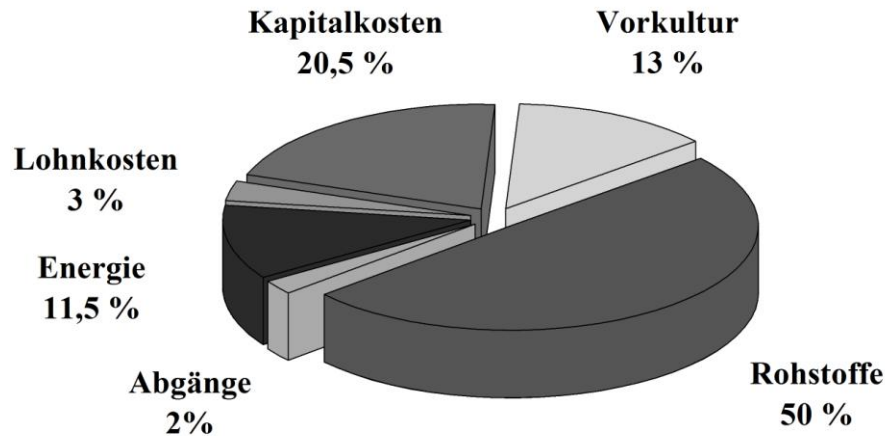


Abbildung 2.5: Kostenverteilung der mikrobiellen 1,3-PD-Produktion [Hirschmann et al. 2005]

Glycerin und Hefeextrakt stellen dabei die größten Kostenfaktoren unter den Rohstoffen dar. Daher wird ersichtlich, dass sich durch die Nutzung preisgünstigen Rohglycerins und dem Ersatz des Hefeextraktes die Gesamtprozesskosten deutlich verringern lassen.

2.4 Stoffwechsel der 1,3-PD Produktion

Glycerin gelangt bei hohen Konzentrationen über passive Diffusion in das Zellinnere [daSilva et al. 2009]. Bei niedrigen Konzentrationen kann der Glycerintransport mit Hilfe eines „Glycerin Transport Facilitators“ (GlpF) unterstützt werden, welcher einen selektiven passiven Transport erlaubt [Maervoet et al. 2011]. Für *Klebsiella pneumoniae* und *Clostridium perfringens* konnten die zugehörigen Gene bereits nachgewiesen werden [Sun et al. 2003].

In der Zelle wird das Glycerin über eine Kombination mehrerer miteinander verbundener Stoffwechselwege umgesetzt. Im reduktiven Zweig wird es zunächst mittels einer Glycerin-Dehydratase zu 3-Hydroxypropionaldehyd dehydratisiert. Diese Reaktion ist gleichzeitig der geschwindigkeitsbestimmende Schritt, wodurch die Anhäufung dieses toxischen Zwischenproduktes verhindert wird [Abbad-Andaloussi et al. 1996]. Das 3-Hydroxypropionaldehyd wird anschließend mit Hilfe der 1,3-PD-Dehydrogenase zu 1,3-Propandiol reduziert. Da der zweite Schritt unter Verbrauch von NADH_2 geschieht, dient die Umsetzung von Glycerin zu

1,3-Propandiol der Regenerierung von Reduktionsäquivalenten, welche bei der Biomassebildung bzw. im oxidativen Stoffwechselweg anfallen. Da sich Glycerin gegenüber der durchschnittlichen Biomassezusammensetzung ($C_4H_7O_2N$) in einen reduzierterem Zustand befindet, werden bei der Biomassebildung Reduktionsäquivalente frei, welche anschließend bei der 1,3-Propandiolbildung umgesetzt werden können [Biebl et al. 1999]. Im Rahmen des oxidativen Stoffwechsels wird Glycerin zu Dihydroxyaceton oxidiert. Nach Phosphorylierung kann das gebildete Dihydroxyacetonphosphat über den Glykolyse-Stoffwechsel zu Pyruvat umgesetzt werden [Steverding 2010]. Die weitere Umsetzung des Pyruvats variiert in Abhängigkeit vom Typ des Mikroorganismus. Hauptnebenprodukte des Glycerinstoffwechsels sind neben Acetat für Enterobacteriaceae, wie z. B. *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii* oder *Enterobacter agglomerans*, unter anderem Ethanol, Milchsäure oder 2,3-Butandiol. Für Clostridiaceae sind es Buttersäure bei *Clostridium butyricum* oder Butanol bei *Clostridium pasteurianum* [Zeng et al. 2002]. Zusätzliche Nebenprodukte können in Form von Succinat oder Formiat auftreten. Die im Rahmen der Pyruvatumsetzung in Form von ATP generierte Energie wird für das Wachstum benötigt. Eine Übersicht über den anaeroben Glycerinstoffwechsel findet sich in Abbildung 2.6.

Da sich die Stoffwechselwege flexibel gestalten, variiert das Spektrum der Nebenprodukte bzw. deren Verhältnis zueinander in Abhängigkeit von dem Stamm, den Fermentationsbedingungen und der Medienzusammensetzung. Auf der einen Seite ist die Bildung von Buttersäure für die Biomassebildung durch die höhere Energiegewinnung effizienter. Die Essigsäurebildung ermöglicht dagegen jedoch höhere Ausbeuten an 1,3-Propandiol [Zeng 1996]. Für eine kontinuierliche Fermentation mit *Clostridium butyricum* wurde gezeigt, dass niedrige Verdünnungsraten die Buttersäure-Produktion begünstigen, wohingegen die Essigsäure-Produktion bei Erhöhung der Durchflussraten überwiegt [Papanikolaou et al. 2000]. Des Weiteren kann die unterschiedliche Toxizität der Nebenprodukte, z. B. in Abhängigkeit vom pH-Wert, zu einer Verschiebung innerhalb des Stoffwechsels führen [Zeng et al. 1994]. Limitierungen von Medienbestandteilen können sich ebenfalls auf die Nebenprodukte auswirken. Bei *Clostridium pasteurianum* führte beispielsweise eine Eisen-Limitierung während der Glycerinfermentation zu einer deutlichen Verschiebung von der Butanol- hin zur Lactat-Bildung [Dabrock et al. 1992].

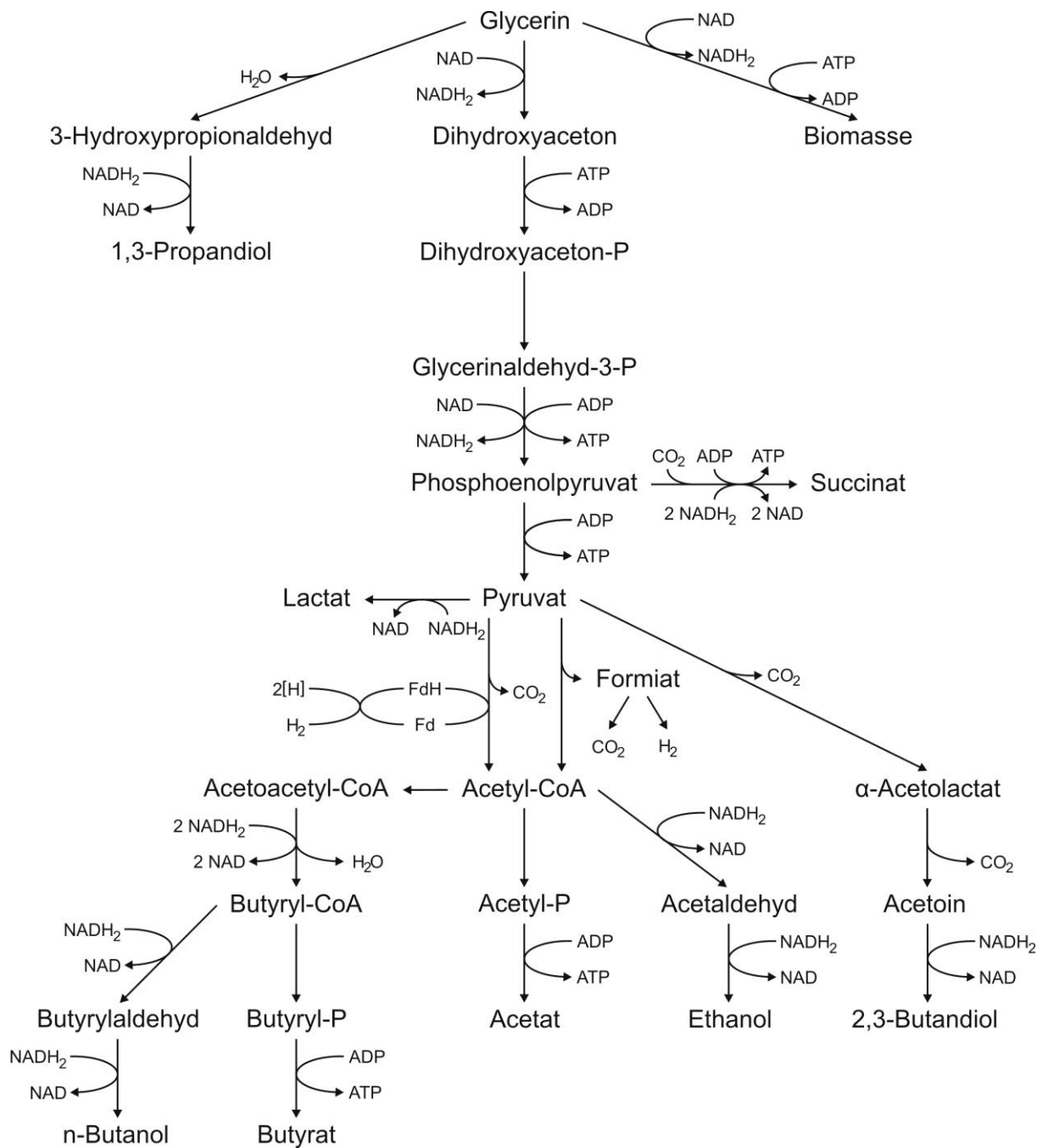


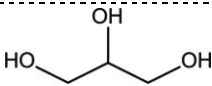
Abbildung 2.6: Anaerober Glycerinstoffwechsel [Biebl et al. 1999]

Die für *Clostridium butyricum* berechnete theoretische maximale Ausbeute liegt bei $0,72 \text{ mol}_{1,3\text{-PD}} \cdot \text{mol}_{\text{Gly}}^{-1}$, wenn Glycerin im Überschuss vorliegt [Zeng 1996]. Dieser Wert kann jedoch nur erreicht werden, wenn weder Buttersäure noch Wasserstoff gebildet werden. Der aus der Bildung anderer Nebenprodukte resultierende Verbrauch an NADH₂ führt jedoch zu einer Verringerung der 1,3-PD-Ausbeute.

2.5 Glycerin

Bei Glycerin handelt es sich um eine klare, geruchs- und geschmacklose, hoch viskose Flüssigkeit, welche zur Stoffklasse der Zuckeralkohole gehört. Die Tabelle 2.3 gibt einen Überblick über Stoffeigenschaften des Glycerins.

Tabelle 2.3: Eigenschaften Glycerin $\geq 98\%$ (MSDS, Carl-Roth GmbH + Co. KG)

Allgemeines	
Strukturformel	
Name	Glycerin
Synonyme	Glycerol, 1,2,3-Propantriol
Summenformel	$C_3H_8O_3$
EU-Nummer	200-289-5
CAS-Nummer	56-81-5
Chemische und physikalische Eigenschaften	
Molare Masse	$92,09 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
Löslichkeit	vollständig in Wasser mischbar
Dichte	$1,26 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (20 °C)
pH-Wert	5,0 ($100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, H_2O , 20 °C)
Schmelzpunkt	18,2 °C
Flammpunkt	160 °C
Siedepunkt	290 °C
Zündtemperatur	400 °C
Dampfdruck	$< 0,001 \text{ hPa}$ (20 °C)
Brechungsindex	1,470 (20 °C)
Toxikologische Eigenschaften	
$LD_{50,oral}$	$LD_{50,Ratte} 12600 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$
$LD_{50,dermal}$	$LD_{50,Kaninchen} > 18700 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$

2.5.1 Anwendungsmöglichkeiten von Glycerin

Glycerin bietet eine große Bandbreite an Anwendungsmöglichkeiten. Eine direkte Verbrennung von Rohglycerin liefert eine zu verschiedenen Biomassen (z. B. Stroh oder

Holzspäne) vergleichbare Verbrennungswärme [Stelmachowski 2011]. Alternative Nutzungswege von Glycerin zur Kraftstoff- oder Energieerzeugung bieten sich z. B. durch die Produktion von Biogas über anaerobe Biokonversion [Lopez et al. 2009] oder Wasserstoff mittels Dampfreformierung [Douette et al. 2007] bzw. Photokatalyse [Bowker et al. 2009]. Weiterhin könnten Kraftstoffzusätze auf Glycerinbasis, wie z. B. Glycerinether, mit Biodiesel versetzt werden um eine Erhöhung der Oktanzahl oder eine Emissionsreduzierung zu erreichen [Rahmat et al. 2010]. Glycerin aus nachwachsenden Rohstoffen wird ebenfalls großes Potenzial als „grünes“ Lösemittel, z. B. für Biokatalysen oder zur Beeinflussung der Regioselektivität, eingeräumt [Gu et al. 2010]. Glycerin ist ebenfalls für die Produktion einiger Sprengstoffe, wie z. B. Dynamit, von Bedeutung. Weiterhin wird es zu ca. 1 - 5 % bei der Produktion von Tabakwaren als Feuchthaltemittel oder Trägerstoff für die Aromatisierung eingesetzt [Carmines et al. 2005]. Im Rahmen der Nahrungsmittelproduktion kommt es in Form von Nahrungsergänzungsmittel E422 als Feuchthaltemittel zur Anwendung. Im Bereich Körperpflege, wie z. B. Kosmetik, Seifen oder Zahnpasta, findet Glycerin ebenfalls Anwendung. Rohglycerin wird im Rahmen der Schweine- oder Hühnerzucht dem Futter als alternative Energiequelle beigemischt [Lammers et al. 2008]. Einen Überblick über die durchschnittliche weltweite Verteilung der Glycerinnutzung findet sich in Abbildung 2.7.

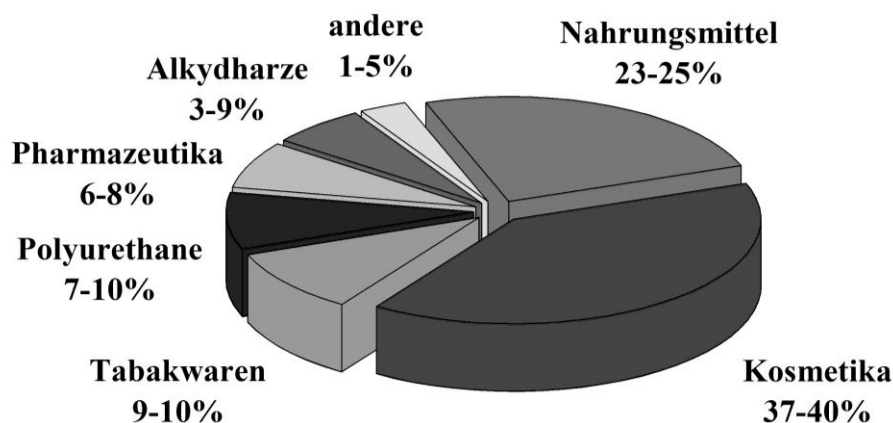


Abbildung 2.7: Durchschnittliche weltweite Glycerinnutzung [Stelmachowski 2011]

Glycerin kann im Rahmen mikrobiologischer Fermentationsprozesse als Energie- und Kohlenstoffquelle dienen. Neben 1,3-Propandiol kann es unter anderem zur Produktion von Ethanol, Zitronensäure, Dihydroxyaceton, Propionsäure oder Bernsteinsäure eingesetzt werden. Weiterhin wird es im Rahmen der Produktion von Pigmenten, rekombinanten Proteinen und Enzymen sowie Antibiotika verwendet [daSilva et al. 2009].

2.5.2 Glycerinquellen

Glycerin kann durch mikrobiologische Fermentation oder chemische Synthese gewonnen werden [daSilva et al. 2009]. In Ölen und Fetten ist es in Form von Triglyceriden enthalten. Im Rahmen der Verseifung werden diese durch Erwärmen mit Natronlauge in die Natriumsalze der Fettsäuren (Seifen) und Glycerin gespalten. Die durch Wasserdampfszufuhr bei hoher Temperatur und Druck durchgeführte Fettspaltung liefert dagegen die freien Fettsäuren und Glycerin [Bock 2004]. Eine Hauptquelle für Glycerin ist die Umesterung von Pflanzenölen oder tierischen Fetten mit Alkohol im Rahmen der Biodieselherstellung (siehe Abbildung 2.8.) Hierbei werden pro Tonne Biodiesel 100 kg Glycerin als Nebenprodukt gebildet [Yazdani et al. 2007].

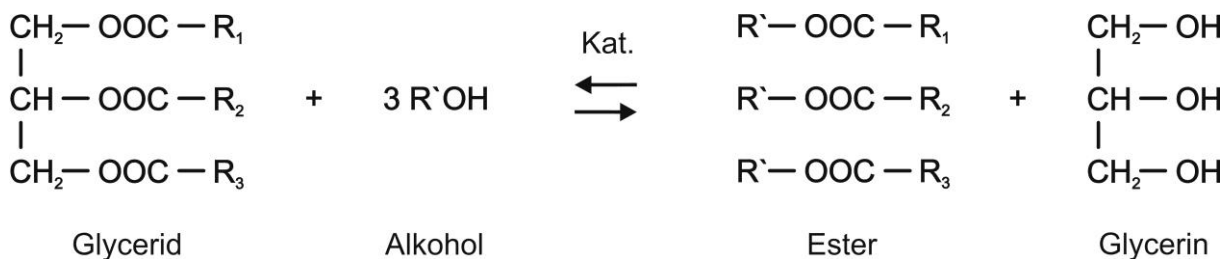


Abbildung 2.8: Umesterung von Triglyceriden mit Alkohol [Ma et al. 1999]

Der Katalysator kann entweder alkalischen (z. B. NaOH, KOH), sauren (z. B. H₂SO₄, HCl) oder enzymatischen (Lipase) Ursprungs sein. Alkalische Katalyse bietet den Vorteil einer recht hohen Reaktionsgeschwindigkeit und niedrigen Kosten des Katalysators. Dem gegenüber steht eine schwierigere Aufarbeitung des Glycerins durch die notwendige Abtrennung des Katalysators. Zusammen mit einer langsameren Reaktionsgeschwindigkeit gilt dies ebenfalls für die saure Katalyse. Jedoch ist bei dieser die erzielbare Ausbeute an Estern sehr hoch, da freie Fettsäuren nicht als Seifen (Salz der Fettsäuren) anfallen. Für Lipase katalysierte Umesterungen ergibt sich im Fall einer Enzymimmobilisierung die Möglichkeit der wiederholten Nutzung des Katalysators und einer deutlich vereinfachten Produktaufarbeitung [Marchetti et al. 2007]. Bei dem für Umesterungsreaktionen verwendeten Alkohol handelt es sich meist um Methanol (preisgünstig) oder Ethanol (geringere Toxizität).

Die in Abbildung 2.9 dargestellte Übersicht zeigt die Biodiesel- und Glycerinproduktion der Biodiesel Schwarzheide GmbH. Von dieser Firma wurden die in dieser Arbeit verwendeten Rohglycerine bezogen.

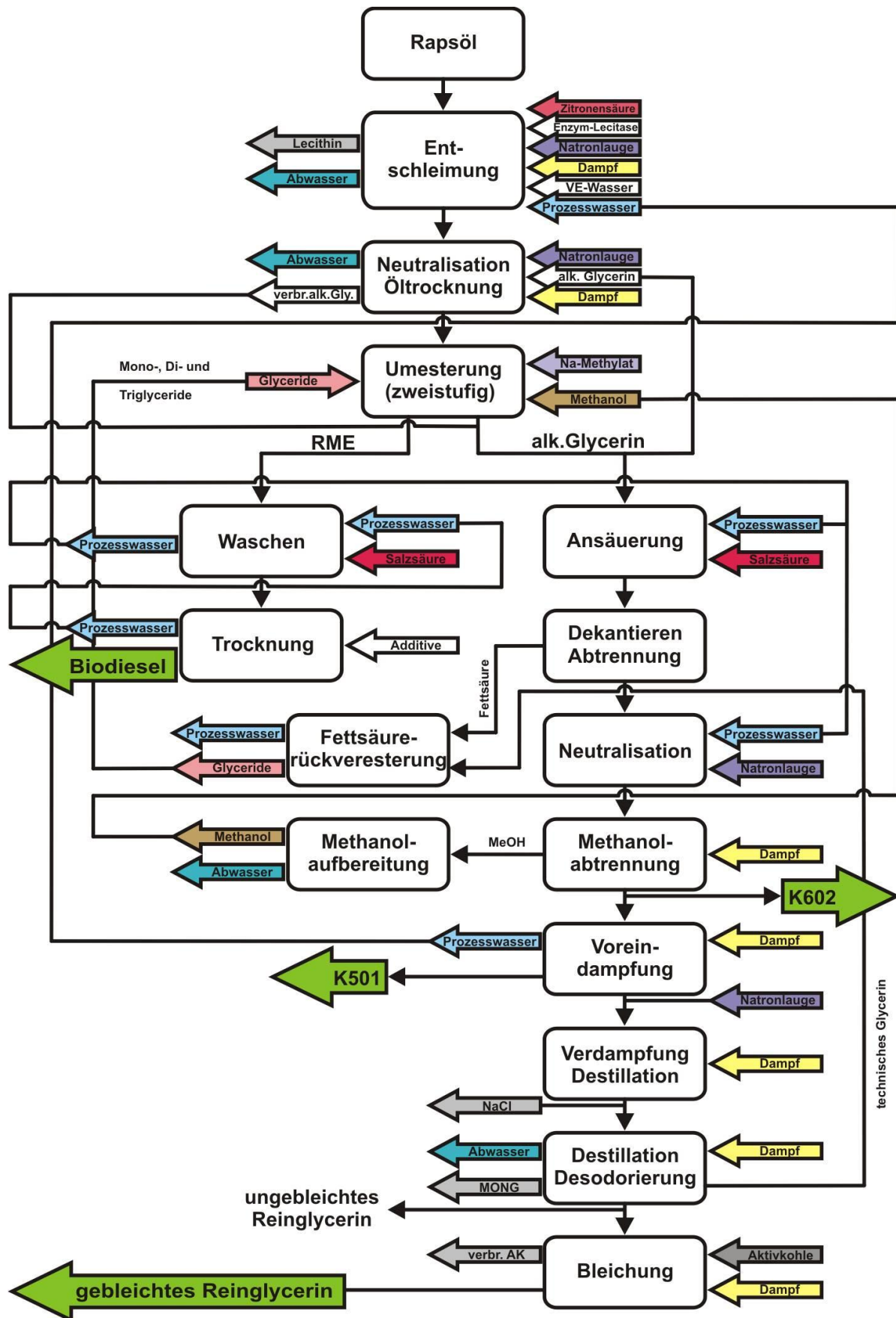


Abbildung 2.9: Anlagenfließbild für die Biodiesel-/Glycerinproduktion der Biopetrol Schwarzheide GmbH (Standort Schwarzheide) nach Prozessumstellung auf Salzsäure und Natriummethylat

Das im Rahmen der Biodieselproduktion anfallende Glycerin durchläuft mehrere Aufarbeitungsstufen. Nach der Umesterung wird das Rohglycerinwasser angesäuert, die Fettsäuren dekantiert, eine Neutralisation vorgenommen und das Methanol abgetrennt. Nach mehreren Aufkonzentrierungsschritten werden Salz und MONGs (Matter Organic Non Glycerol) entfernt, eine Desodorierung vorgenommen und das Glycerin mit Aktivkohle gebleicht. Am Ende der Aufbereitung steht Glycerin in Pharmaqualität. Aus ökonomischen Gründen wurde von der Biodiesel Schwarzheide GmbH der Katalysator der Umesterungsstufe von Kalium- auf Natriummethylat und die Säure des Ansäuerungsschrittes von Schwefel- auf Salzsäure umgestellt. Durch die Nutzung von Rohglycerin einer niedrigeren Aufarbeitungsstufe können mehrere zeit- und kostenintensive Prozessschritte eingespart werden.

Im Angesicht endlicher fossiler Ressourcen und steigender Ölpreise stellen biobasierte Kraftstoffe eine interessante Alternative zu konventionellen Kraftstoffen dar. Weiterhin schreibt eine Reihe weltweiter Gesetzesvorlagen die erhöhte Beimischung biobasierter Treibstoffe vor (z. B. USA: renewable fuel standard; EU: Erneuerbare-Energien-Richtlinie). Dies resultiert in einem kontinuierlichen Anstieg der globalen Biodieselproduktion, dessen prognostiziertes Volumen 2020 bei ca. 40 Milliarden Liter liegen wird (siehe Abbildung 2.10 und Abbildung 2.11).

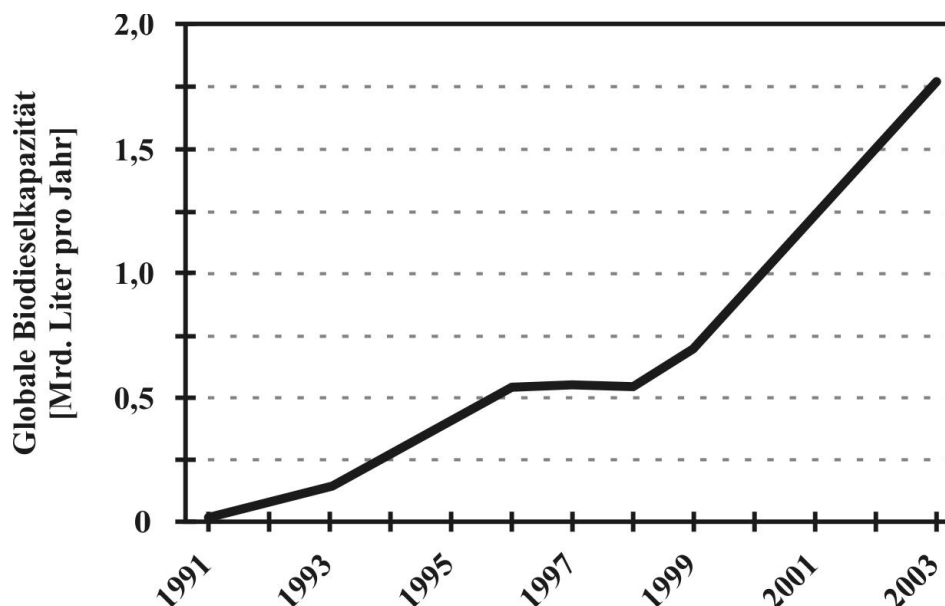


Abbildung 2.10: Globale Biodieselpazität für die Jahre 1991-2003 (Biofuels For Transport - An International Perspective, International Energy Agency, 2004)

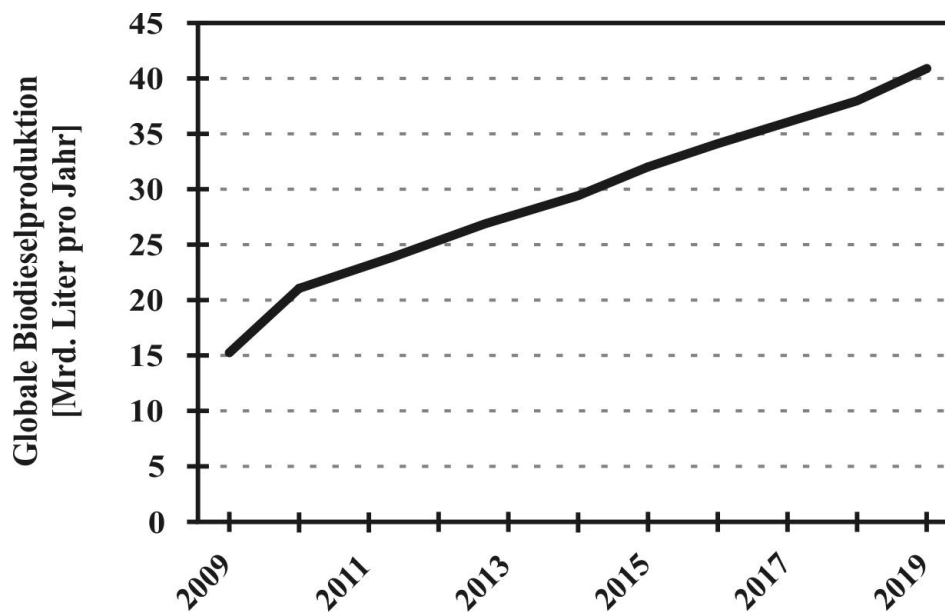


Abbildung 2.11: Geschätzte globale Biodieselproduktion für die Jahre 2009-2019 (Agricultural Outlook 2010-2019 - Biofuel Production, OECD/FAO 2011)

In Folge der massiv steigenden Biodieselproduktion sinkt der Preis für Rohglycerin trotz einiger Schwankungen kontinuierlich. Beispielsweise sanken die durchschnittlichen Preise für Glycerin in den USA zwischen 1995 und 2010 um 67 % (Oleochemicals: Low glycerin price drives new uses, www.icis.com, August 2010). Der US-Rohglycerinpreis bewegte sich zwischen Anfang und Ende 2010 in einem Bereich von 5 - 15 US-Cent pro Pfund (ca. 70 - 210 Euro pro Tonne) (biodieselmagazine.com, Januar 2011). Diese Angaben entsprechen den von der Biopetrol Schwarzheide GmbH erhaltenen Preisauskünften von 40 - 60 Euro pro Tonne Rohglycerin (80 %) im September 2009 bzw. 180 Euro pro Tonne Rohglycerin (80 %) im August 2010. 2011 lag der Preis für Rohglycerin in den USA bei 5 - 7 US-Cent pro Pfund (ca. 70 - 100 Euro pro Tonne) (www.icispricing.com, Juni 2011).

Da mit dem Rohglycerinpreis tendenziell auch der Preis für Pharmaglycerin fällt, ist eine teure Glycerinaufarbeitung für die meisten Biodieselproduzenten nicht mehr ökonomisch realisierbar. Durch die Nutzung von Rohglycerin im Rahmen mikrobieller Konversionsprozesse eröffnet sich der Biodieselindustrie daher ein neuer Absatzmarkt für dieses Nebenprodukt. Weiterhin erhält die Industrielle Biotechnologie Zugriff auf ein preisgünstiges Substrat mit einer langfristigen Versorgungssicherheit.

2.5.3 Verwertbarkeit der Rohglycerine

Rohglycerine bzw. Rohglycerinwässer können sich in Abhängigkeit ihres Ursprungs stark im Glyceringehalt unterscheiden. Für Rohglycerinwässer aus Verseifungs- und Fettabspaltungsanlagen liegt der Gehalt vor der Aufkonzentrierung zwischen 10 bis 20 %. Im Gegensatz dazu enthalten Rohglycerinwässer aus Umesterungsanlagen bereits 35 bis 65 % Glycerin [Bock 2004]. Potenzielle Verunreinigungen des Rohglycerins, wie z. B. Methanol, freie Fettsäuren, Seifen, Schwermetalle oder Salze, können sich negativ auf die mikrobielle Konversion zu 1,3-Propandiol auswirken [Petitdemange et al. 1995; Chatzifragkou et al. 2010]. Methanol, Seifen, Natrium und Schwermetallionen inhibieren die Zellteilung, wohingegen natürliche Komponenten, wie z. B. phenolische Antioxidantien, das Wachstum beeinträchtigen können [Moon et al. 2010]. Während gesättigte Fettsäuren einen geringen Einfluss auf die Lebensfähigkeit der Zellen haben, können ungesättigte Fettsäuren eine Depolarisierung und Störung der Zellmembranstabilität bewirken [Asad-ur-Rehman et al. 2008]. Die inhibierenden Eigenschaften ungesättigter Fettsäuren steigen dabei mit der Anzahl der Doppelbindungen [Chatzifragkou et al. 2010]. Das Fettsäureprofil hängt vom Ursprung des verwendeten Öls ab. Von den vier Pflanzenöl-Hauptquellen weist Palmöl den verhältnismäßig höchsten Anteil an gesättigten Fettsäuren, Rapsöl an einfach ungesättigten Fettsäuren und sowohl Soja- als auch Sonnenblumenöl an mehrfach ungesättigten Fettsäuren auf [Dubois et al. 2007].

Generell ist der Einfluss von Verunreinigungen stark vom verwendeten Mikroorganismus und der Rohglycerinquelle abhängig. Petitdemange [Petitdemange et al. 1995] berichtet, dass Glycerin aus der Fettspaltung ohne weitere Aufarbeitung eingesetzt werden kann (ähnliche Ergebnisse erzielte auch Bock 2004), wohingegen Glycerin aus der Transesterifikation nicht ohne weiteres verstoffwechselt werden konnte. Ralf Bock [Bock 2004] berichtet weiterhin, dass Rohglycerine aus Verseifungsanlagen in Folge der hohen Salzgehalte einer Vorbehandlung unterzogen werden sollten. Laut Moon [Moon et al. 2010] eignet sich Rohglycerin aus der auf Sojaöl basierenden Biodieselproduktion besser als das aus der auf gebrauchtem Pflanzenöl basierenden Produktion. Weiterhin gab es Unterschiede beim Einsatz von Glycerinen verschiedener Hersteller, selbst bei Verwendung des gleichen Öltyps für die Biodieselproduktion. Die von ihm untersuchten *Klebsiella pneumoniae* Stämme waren unempfindlicher gegenüber unaufbereitetem Rohglycerin als die getesteten *Clostridium butyricum* Stämme. Der von González-Pajuelo [González-Pajuelo et al. 2004] verwendete *Clostridium butyricum* Stamm VPI 3266 wies wiederum eine vergleichbare Toleranz gegenüber kommerziellem Glycerin (87 % w/v) und Rohglycerin (92 % w/v) aus der Biodieselherstellung auf. Jedoch führte ein Rohglycerin eines zweiten Herstellers mit einem

geringeren Glyceringehalt (65 % w/v) zu einer deutlich stärkeren Inhibierung. Generell sind gram-positive Mikroorganismen (z. B. *Clostridium* sp.) anfälliger für die inhibierende Wirkung von Fettsäuren als gram-negative (z. B. *Klebsiella* sp.) [Chatzifragkou et al. 2010].

2.5.4 Aufarbeitung der Rohglycerine

Im Rahmen der industriellen Rohglycerinaufarbeitung werden neben der Ansäuerung, Dekantierung, Destillation und Fällung auch Adsorber, wie z. B. Aktivkohle eingesetzt, um ungewünschte Inhaltsstoffe zu entfernen (siehe Abbildung 2.9). Moon [Moon et al. 2010] konnte durch eine Säurevorbehandlung des Rohglycerins teilweise eine merkliche Verbesserung der 1,3-Propandiol Bildung erzielen. Asad-ur-Rehman [Asad-ur-Rehman et al. 2008] entfernte durch Dekantierung eine fettsäurehaltige Schicht und führte anschließend mehrere Waschschritte mit n-Hexanol durch. Neben der Fettsäureabtrennung bringt die Entfernung der Schwimmschicht einen weiteren positiven Effekt mit sich: Wittlich [Wittlich 2001] beobachtete, dass sich ein Großteil der in dem von ihm untersuchten Rohglycerin enthaltenen Metallionen, wie z. B. Kupfer, Zink, Aluminium, Chrom oder Blei, in einer aufschwimmenden Ölschicht anreicherte. Dieser Effekt ist möglicherweise auf das Vorhandensein von Schwermetallligninen zurückzuführen [Papanikolaou et al. 2000]. Somit kann die Entfernung der Schwimmschicht neben der Abtrennung wachstumshemmender Fettsäuren auch eine Reduzierung hemmender Metallionen bewirken. Bock untersuchte eine Vielzahl weiterer Vorbehandlungsmethoden. Zu ihnen zählten Flüssig-Flüssig-Extraktionen mit Biodiesel und Rapsöl, An- und Kationentauscher sowie die Aufreinigung mittels Elektrodialyse. Hierbei führten die Flüssig-Flüssig-Extraktionen zu keiner Verbesserung der Fermentationsergebnisse. Die Aufreinigung mit einem Anionentauscher resultierte in einem Anstieg der 1,3-PD-Konzentration, jedoch bei gleichzeitiger Verringerung der Produktivität. Eine Kombination aus Kat- und Anionentauscher erbrachte ebenfalls eine deutliche Produktivitätsverschlechterung. Die Elektrodialyse lieferte von allen getesteten Verfahren das beste Ergebnis [Bock 2004]. Weiterhin zeigten Anand und Saxena [Anand et al. 2012] eine erfolgreiche Vorbehandlung von Rohglycerinen durch Waschen mit unpolaren Lösemitteln, wie z. B. Petroleumether und Hexan.

2.6 Substrat- und Produkthemmung

Die mikrobielle Umsetzung von Glycerin unterliegt einer Substrat- sowie Produkthemmung. Die Wachstumsinhibierung von *Clostridium butyricum* durch Glycerin, 1,3-Propandiol, Essig- und Buttersäure stellt eine lineare Funktion der Konzentration des jeweiligen Inhibitors dar. Weiterhin wurde gezeigt, dass extern zugegebenes 1,3-Propandiol die gleiche inhibierende Wirkung besitzt wie durch die Zelle produziertes. Die Inhibierung durch von den Mikroorganismen selbst produzierte Buttersäure und Essigsäure scheint jedoch deutlich über der Wirkung extern zugegebener Säuren zu liegen [Zeng et al. 1994].

Der Einfluss des 1,3-Propandiols auf das Wachstum scheint hierbei bedeutender zu sein als der auf die Umsetzung des Glycerins selbst. Es wird vermutet, dass die inhibierende Wirkung auf der Diol-Funktion und nicht auf einer spezifischen Eigenschaft des 1,3-Propandiols oder einer Änderung des osmotischen Drucks beruht. Die Wirkung könnte einerseits auf einer Beeinflussung der Membranfluidität oder andererseits auf der Inhibierung membranständiger ATPasen und Transportmechanismen beruhen, welches eine Unterdrückung des transmembranen pH-Gradienten zur Folge hat [Colin et al. 2000]. Da bisher für 1,3-Propandiol kein aktiver Transport bekannt ist, steigt die Konzentration innerhalb der Zelle somit im Fermentationsverlauf stetig an [Sun et al. 2003].

Die inhibierende Wirkung von schwachen Säuren beruht auf der Löslichkeit der undissoziierten Form in der Cytoplasmamembran, wohingegen die ionisierte Form unlöslich ist. Daher sind anaerobe Säureproduzenten nicht in der Lage einen konstanten internen pH aufrecht zu erhalten [Menzel et al. 1985]. Die Ansäuerung des Cytoplasmas führt somit zu einem Zusammenbruch des Protonengradienten und zur Inhibierung des Nährstofftransports [Goncalves et al. 1997]. Die Toxizität der Säure ist stark vom herrschenden pH-Wert abhängig. So wirkt Essigsäure bei einem niedrigerem pH-Wert toxischer als Buttersäure, während sich dies bei neutralen pH-Wert umkehrt [Zeng et al. 1994]. Für *Clostridium butyricum* wurden die hemmenden Konzentrationen an undissoziierter Essig- bzw. Buttersäure bei pH 6,5 bestimmt. Sie betragen $0,49 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ bzw. $0,39 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ [Biebl 1991] bei einer korrespondierenden Gesamtsäurekonzentration von 27 bzw. $19 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Nach Colin [Colin et al. 2001] liegt jedoch der Anteil der undissoziierten Säure bei pH 7 sogar für Säurekonzentrationen bis zu $25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ deutlich unter den von Biebl angegebenen Konzentrationen. Das legt den Schluss nahe, dass die Produkthemmung bei der Glycerinfermentation unter neutralen Bedingungen primär auf den Eigenschaften des 1,3-Propandiols bzw. einem kombinierten Effekt beruht.

Hohen Substratkonzentrationen kann durch die Wahl der Prozessführung, wie z. B. Fed-Batch, entgegengewirkt werden. Ein kontinuierlicher Prozess erlaubt die ständige Entfernung toxischer Stoffwechselprodukte aus dem Medium. Weiterhin kann der Einfluss der Substrat- oder Produkthemmung durch gezieltes Screening nach toleranten Stämmen [Ringel 2012], durch Mutation bzw. genetische Modifizierung [Otte et al. 2009] oder auch durch Adaption an erhöhte Konzentrationen minimiert werden.

2.7 Hefeextraktersatzstoffe

Hefeextrakt ist das Konzentrat der löslichen Bestandteile von Hefezellen. In Europa wird er überwiegend durch Autolyse (Eigenverdau) von *Saccharomyces cerevisiae* Stämmen gewonnen. Alternativ können auch Thermolyse (z. B. Kochen), Plasmolyse (hohe Salzkonzentrationen) oder ein mechanischer Aufschluss (z. B. Hochdruckhomogenisator) zum Einsatz kommen [Sommer 1998]. Nach erfolgtem Aufschluss wird der Hefeextrakt durch mehrere Aufkonzentrierungsschritte und anschließende Trocknung zum fertigen Produkt aufgearbeitet. Der typische Hefeextrakt beinhaltet bis zu 75 % Protein sowie Polysaccharide (z. B. Mannane und Glucane), Vitamine, Mineralien und Nukleotide [Sommer 1998]. Durch seinen sehr hohen Gehalt an Nährstoffen und Wachstumsfaktoren findet er weitverbreitete Anwendung im Bereich mikrobiologischer Fermentationsmedien. Auf Grund seines sehr hohen Einkaufspreises von ca. 9200 \$ pro Tonne (ca. 6000 €) [Maddipati et al. 2011] ist die Anwendung von Hefeextrakt jedoch nicht für jeden Biokonversionsprozess ökonomisch sinnvoll.

Die Anwendung alternativer Stickstoff- und Vitaminquellen ist daher von großem Interesse. Eine Möglichkeit besteht in der Substitution des Hefeextraktes durch definierte Komponenten. Für die Konversion von Glycerin zu 1,3-Propandiol mit Stämmen von *Clostridium butyricum* wurde über den erfolgreichen Einsatz von mit Vitaminen angereicherten Mineralsalzmedien berichtet [Himmi et al. 1999; González-Pajuelo et al. 2004]. Eine Alternative zu definierten Medien stellt der Einsatz komplexer Substanzen dar. Hirschmann [Hirschmann et al. 2005] setzte für die mikrobielle Produktion von 1,3-PD erfolgreich Kartoffelrestfruchtwasser (potato nitrogen concentrate) ein. Für den ebenfalls anaeroben Prozess der Milchsäureproduktion sind eine Vielzahl von Publikationen zur Nutzung von alternativen Stickstoff- und Nährstoffquellen veröffentlicht worden. Einige Beispiele sind: Saft der Persimone mit hydrolysierten Weizenkleie [Lu et al. 2010]; Vitaminangereicherter Malzkeim- oder Grasextrakt [Hujanen et al. 1996]; Maisquellwasser und

hydrolysierte Weizenkleie [Li et al. 2010]; Vitamin-angereichertes Sojabohnenhydrolysat [Kwon et al. 2000]; Rote Linsen und Zellen von Bäckerhefe [Altaf et al. 2007] oder hydrolysierter Fischabfall kombiniert mit abgestorbenen Bakterienzellen [Gao et al. 2007]. Betrachtet man die Auswahl der dargestellten Substanzen wird das sehr weitgefasste Spektrum potenzieller Hefeextraktersatzstoffe deutlich. Es reicht von Materialien pflanzlichen oder tierischen Ursprungs bis hin zur Wiederverwendung des Zellmaterials selbst.

3 Material und Methoden

3.1 Verwendete Mikroorganismen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden ausschließlich gram-positive Sporenbildner eingesetzt, welche aus Palmölkompost bzw. Bodenproben am Institut für Agrartechnologie und Biosystemtechnik des vTI isoliert wurden [Ringel 2012]. Die für den Hauptteil der Versuche genutzten Stämme AKR 17a und AKR 102 wurden als *Clostridium butyricum* identifiziert. Diese Identifizierung erfolgte durch die DSMZ (Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen) auf Basis partieller 16S rRNA- sowie Fettsäureanalyse.

3.2 Chemikalien, Medien und Lösungen

Im Folgenden werden die verwendeten Kulturmedien, Lösungen und Chemikalien dargestellt. Sofern nicht an entsprechender Stelle in diesem Kapitel näher beschrieben, sind die wichtigsten verwendeten Chemikalien der Tabelle 6.1 im Anhang zu entnehmen.

3.2.1 Mineralsalzmedium

Sämtliche für die Versuche genutzten Medien basieren auf einem mit Phosphat gepuffertem Mineralsalzmedium (siehe Tabelle 3.1). Da nur die Fermenter über eine Möglichkeit zur automatischen pH-Korrektur verfügten, weisen die anderen Standardmedien eine stark erhöhte Phosphatkonzentration auf, welche der pH-Pufferung dient. Es ist zu beachten, dass für Versuche im 96-Well-Mikrotitermaßstab auf die Zugabe von Resazurin verzichtet wurde, um eine Beeinträchtigung der Bestimmung der optischen Dichte durch die Farbänderung des Indikators zu vermeiden.

Auf individuelle Abweichung der Medienzusammensetzung (z. B. Austausch des Hefeextraktes) wird im Rahmen der jeweiligen Versuchsbeschreibung hingewiesen. Für die Fermentationen im 10 L bzw. 200 L-Maßstab wurde das Medium konzentriert angesetzt und

nach Überführung in den Fermenter mit deionisiertem Wasser auf das gewünschte Volumen aufgefüllt.

Tabelle 3.1: Standardansatz der verwendeten Kulturmedien

Komponente	Menge	
	Fermenter	96-Well / Vial
KH₂PO₄	2,71 g	9,09 g
NH₄Cl	2,69 g	0,53 g
MgSO₄ · 7 H₂O	0,1857 g	0,123 g
CaSO₄ · 2 H₂O	0,025 g	0,017 g
FeSO₄ · 7 H₂O	0,015 g	0,01 g
Hefeextrakt	5 g	1 – 2 g
Glycerin	variabel	variabel
SL* DSMZ 144 (5x konz.)	3 mL	2 mL
Resazurin 0,1 %	0,71 mL	1 mL
H₂O (< 5 µS)	ad 1000 mL	ad 1000 mL
pH-Wert	7	7,5
L-Cystein · HCl	0,1571 g**	0,25 g

* SL = Spurenelementelösung; ** in Form einer 5 %igen-Lösung

Im Nachfolgenden werden für die Medien Kurzbezeichnungen verwendet. Dabei wird sich nur auf die Art des Glycerins sowie den Hefeextrakt bzw. seinen Ersatz bezogen. Hierbei wird Pharmaglycerin durch PG und Rohglycerin durch RG abgekürzt. Durch Indizes erfolgt die Angabe der Glycerinkonzentration. Hefeextrakt wird durch HE und die verwendeten Ersatzsubstanzen durch entsprechende Abkürzungen gekennzeichnet. Analog zum Glycerin bezeichnet hierbei ein Index die eingesetzte Startkonzentration. Durch PG²⁵HE⁵ wird demnach ein Medium mit 25 g·L⁻¹ Pharmaglycerin und 5 g·L⁻¹ Startheefeextrakt bezeichnet. RG_{K602}²⁵HE⁵ steht für ein Medium mit einem Glyceringehalt von 25 g·L⁻¹ in Form von Rohglycerin K602 und 5 g·L⁻¹ Startheefeextrakt. Zur Unterscheidung wird für 96-Well- bzw. Vialmedien der Index Vial angefügt um auf die unterschiedliche Zusammensetzung hinzuweisen.

In Tabelle 3.2 sind die Abkürzung der verwendeten Medien näher beschrieben.

Tabelle 3.2: Übersicht der verwendeten Medienbezeichnungen

Bezeichnung Medium	Glycerintyp	Glycerinstart- konzentration* [g·L ⁻¹]	Hefeextraktstart- konzentration [g·L ⁻¹]	Mineralsalz- medium (siehe Tabelle 3.1)
PG²⁵	Pharmaglycerin	25	Angabe im Text	Fermenter
PG¹²⁵	Pharmaglycerin	125	Angabe im Text	Fermenter
PG²⁵HE⁵	Pharmaglycerin	25	5	Fermenter
PG²⁵HE^X	Pharmaglycerin	25	variabel	Fermenter
PG^XHE⁵	Pharmaglycerin	variabel	5	Fermenter
PG²⁵_{Vial}	Pharmaglycerin	25	Angabe im Text	Vial
PG²⁵HE^{0,1}_{Vial}	Pharmaglycerin	25	0,1	Vial
PG²⁵HE¹_{Vial}	Pharmaglycerin	25	1	Vial
PG²⁵HE²_{Vial}	Pharmaglycerin	25	2	Vial
PG^XHE²_{Vial}	Pharmaglycerin	variabel	2	Vial
PG²⁵HE^X_{Vial}	Pharmaglycerin	25	variabel	Vial
<hr/>				
RG_{K602}²⁵	Rohglycerin K602	25	Angabe im Text	Fermenter
RG_{K602}²⁵HE⁵	Rohglycerin K602	25	5	Fermenter
RG_X²⁵HE⁵	variabel	25	5	Fermenter
RG_{K602}²⁵HE^{0,1}_{Vial}	Rohglycerin K602	25	0,1	Vial
RG_{K602}²⁵HE²_{Vial}	Rohglycerin K602	25	2	Vial
RG_X^XHE²_{Vial}	variabel	variabel	2	Vial

* tatsächliche Glycerinkonzentration; Rohglycerin: entspricht nicht der eingesetzten Menge an Rohglycerin, da hier der Glycingehalt im Vergleich zu Pharmaglycerin geringer ist

3.2.2 Spurenelementlösung zu DSMZ-Medium 144 (SL)

Die Zusammensetzung richtet sich nach einer von der deutschen Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, D) für das Medium 144 veröffentlichten Spurenelementlösung. Zur Erhöhung der Einwaagegenauigkeit wurde die Lösung in fünffacher Konzentration angesetzt (siehe Tabelle 3.3). Nach Einwaage der Chemikalien wurde der pH-Wert auf 7,5 eingestellt und die Lösung bei 4 °C gelagert.

Tabelle 3.3: Spurenelementlösung zu DSMZ-Medium 144 (5x konzentriert)

Komponente	Menge [g]
Nitrilotriessigsäure	64,00
$\text{FeCl}_3 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	1,00
$\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	0,50
$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,85
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,50
ZnCl_2	0,50
CuCl_2	0,10
H_3BO_3	0,05
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,05
$\text{NiCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,13
NaCl	5,00
$\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0,10
<hr/>	
$\text{H}_2\text{O} (<5\mu\text{S})$	ad 1000 mL
<hr/>	
pH	7,5

3.2.3 Vitaminlösung zu DSMZ-Medium 141 (VL)

Die Zugabe von Vitaminen erfolgte in Form einer von der deutschen Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, D) für das Medium 141 veröffentlichten Lösung. Zur Erhöhung der Einwaagegenauigkeit wurde die Lösung in zehnfacher Konzentration angesetzt (siehe Tabelle 3.4). Nach Herstellung der Lösung wurde diese lichtgeschützt bei 4 °C gelagert. Die Zugabe zu Medien erfolgte in sterilfiltrierter Form (0,22 µm Rotilabo®-Spritzenfilter, Carl-Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D).

Tabelle 3.4: Vitaminlösung zu DSMZ-Medium 141 (10x konzentriert)

Komponente	Menge [mg]
Biotin	20
Folsäure	20
Pyridoxin-HCl	100
Thiamin-HCl x 2 H₂O	50
Riboflavin	50
Nikotinsäure	50
D-Ca-Pantothenat	50
Vitamin B₁₂	1
p-Aminobenzoessäure	50
Liponsäure	50
.....	
H₂O (<5µS)	ad 1000 mL

3.2.4 Aminosäurelösung (AS)

Die Auswahl und die eingesetzten Mengen der Aminosäuren (L-Aminosäuren für biochemische Zwecke, Merck KGaA, Darmstadt, D) orientierten sich an Angaben verschiedener Hersteller (Merck, BD Difco™, Ohly®) und Literaturwerten [Sommer 1998, Baltes 1970]. Der Ansatz erfolgte in hohen Konzentrationen, da aus der experimentellen Durchführung die Notwendigkeit möglichst kleiner Volumina resultierte. Dabei wurde angestrebt den durchschnittlichen Aminosäuregehalt von 1 g Hefeextrakt durch 1 mL Lösung ersetzen zu können. Die Zusammensetzung der Aminosäurelösung findet sich in Tabelle 3.5.

Tabelle 3.5: Zusammensetzung der Aminosäurelösung

Komponente	Menge [g]
Alanin	60
Arginin	30
Asparagin*	65
Asparaginsäure	60
Glutaminsäure	110
Glycin**	30
Histidin	15
Isoleucin	35
Leucin	50
Lysin***	50
Methionin	10
Phenylalanin	25
Prolin	25
Serin	30
Threonin	30
Tryptophan	15
Tyrosin	15
Valin	40
<hr/>	
H₂O (<5µS)	ad 1000 mL
<hr/>	
* in Form von L-Asparagin-Monohydrat (Ph.Eur.)	
** Glycin (pro analysi Qualität)	
*** in Form von L-Lysin Monohydrat	

Die Lagerung der Lösung erfolgte bei 4 °C.

3.2.5 Glycerin

Als Referenz wurde Glycerin in Pharmaqualität ($\geq 98\%$, Carl-Rot GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D) eingesetzt. Die primär verwendeten Rohglycerine K501 und K602 wurden von der Biopetrol Schwarzheide GmbH (Standort Schwarzheide) bezogen. Sie stellten die am wenigsten aufbereitete Stufe des verfügbaren Glycerins aus der auf Raps basierenden Biodieselproduktion dar. Der Wechsel des Rohglycerins von K501 auf K602 resultierte aus einer aus wirtschaftlichen Überlegungen vorgenommenen Prozessumstellung seitens

BIOPETROL. Hierfür wurde der verwendete Katalysator von Kalium- auf Natriummethylat und die für die Biodieselwäsche eingesetzte Schwefelsäure durch Salzsäure ersetzt. Die Zusammensetzung der Rohglycerine findet sich in Tabelle 3.6.

Tabelle 3.6: Zusammensetzung der verwendeten Rohglycerine (Herstellerangaben)

Rohglycerin	K501	K602
Glyceringehalt [%]	48,0	47,3
Wassergehalt [%]	44,4	49,4
pH-Wert [-]	6,2	5,6
Chlorid [ppm]	10	> 30000
Aschegehalt [%]	3,4	n. b.
Fettsäuregehalt [%]	n. b.	1,0
<hr/>		
Glyceringehalt (HPLC) [% (w/w)]*	46,5	47,3**

* eigene Messung, ** eine Nachlieferung hatte einen Glyceringehalt von 55% (w/w)

Weiterhin wurden im Rahmen eines Versuches einmalig sowohl technisches Glycerin (Glyceringehalt ca. 84 %) als auch gebliches Glycerin (Glyceringehalt ca. 60 %) eingesetzt. Diese wurden an Punkten zwischen der Entnahme des Rohglycerins der niedrigsten Aufarbeitungsstufe und Glycerin der höchsten Qualität (Pharma) entnommen (siehe Abbildung 2.9 und Abbildung 6.1).

3.2.6 Cysteinlösung

Zur Herstellung einer fünfprozentigen Cysteinlösung wurden $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Cystein-Hydrochlorid in der Anaerobierbank in sterilem, sauerstofffreiem $5 \mu\text{S}$ Wasser gelöst und der pH-Wert mittels Natriumhydroxidlösung auf ca. 10 - 11 eingestellt. Die Lösung wurde auf das benötigte Endvolumen aufgefüllt, in 30 mL-Vials abgefüllt und mit Butylgummistopfen (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, D) sowie Metallkappen verschlossen. Anschließend wurden die Vials für 20 min bei 121°C und 1 bar Überdruck autoklaviert (Tuttnauer 2540 EL, Tuttnauer Europe B.V., Breda, NL) und bis zur Verwendung unter anaeroben Bedingungen lichtgeschützt aufbewahrt.

3.2.7 Hefeextraktersatzstoffe

In Tabelle 3.7 findet sich eine Auflistung der eingesetzten komplexen Ersatzstoffe. Die fotografischen Darstellungen sind in Abbildung 3.1 gezeigt.

Tabelle 3.7: Auflistung der Hefeextraktersatzstoffe

Komponente	Hersteller	Herkunft	Verwendung
Hefeextrakt granuliert f. Mikrobiologie	Merck KGaA, Darmstadt, D	Hefelysat	mikrobiolog. Nährmedien
Kartoffelprotein	Emsland-Stärke GmbH, Emlichheim, D	Nebenprodukt der Stärkegewinnung aus Kartoffeln	Tierfutter
Sojaproteinkonzentrat HP 300	Hamlet Protein A/S, Horsens, DK	Biokonversion von Soja	Tierfutter
Fischmehl	VFCux GmbH & Co.KG, Cuxhaven, D	Fischreste	Tierfutter
Griebenmehl	Unimelt GmbH, Würzburg, D	Nebenprodukt beim Ausschmelzen tierischer Rohfette	Tierfutter
Fleischknochenmehl 45 % Protein	KFU GmbH, Marl, D	tierische Nebenprodukte	organischer Dünger
ProtiGrain®	CropEnergies Bioethanol GmbH, Zeits, D	Nebenprodukt der Bioethanolherstellung (DDGS)	Tierfutter
Glutamin 68,9 % Protein	Maus & Co. GmbH, Hamburg, D	getrocknete Biomasse der fermentativen Glutaminsäure-Prod.	Tierfutter
Weizenkleber	Cargill Deutschland GmbH, Krefeld, D	Nebenprodukt der Stärkegewinnung aus Weizenkörnern	Tierfutter, Backwaren
Rapspresskuchen	JKI, Braunschweig, D	Nebenprodukt der Rapsölgewinnung	Tierfutter, Energie
Maisquellwasser	Sigma-Aldrich® Corp., St. Louis, MO, USA	Nebenprodukt der Stärkegewinnung aus Mais	mikrobiolog. Nährmedien, Tierfutter



Abbildung 3.1: Fotos von Hefeextrakt und möglichen Ersatzstoffen

Zur Herstellung von Extrakten wurden 100 g Ersatzstoff mit deionisiertem Wasser auf 1 L aufgefüllt und für 20 min bei 121 °C und 1 bar Überdruck (Tuttnauer 2540 EL, Tuttnauer Europe B.V., Breda, NL) autoklaviert. Anschließend erfolgte die Abtrennung der Feststoffe durch Zentrifugation für 10 min bei 8000 g und 20 °C (Biofuge® stratos, Heraeus Instruments GmbH & Co. KG, Hanau, D). Die erhaltene Lösung enthält somit pro Liter die löslichen Bestandteile aus 100 g Feststoff.

Für die Herstellung eines Rapshydrolysats wurden 5 g Rapspresskuchen mit 15 mL 6 M Schwefelsäure vermennt und über Nacht bei 100 °C in den Trockenschrank (UE400, Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, D) gestellt. Anschließend wurde der pH-Wert mit 5 M NaOH auf 7 bis 7,5 eingestellt. Nach dem Auffüllen auf 100 mL mit deionisiertem Wasser wurden die unlöslichen Bestandteile für 10 min bei 8000 g und 20 °C (Biofuge® stratos, Heraeus Instruments GmbH & Co. KG, Hanau, D) abzentrifugiert und der Überstand bei 4 °C gelagert. Die erhaltene Lösung enthält folglich pro Liter die löslichen Bestandteile aus 50 g hydrolysiertem Feststoff.

Im 96-Well-Mikrotitermaßstab wurden beide Lösungen so eingesetzt, dass die löslichen Bestandteile aus 2 g Feststoff pro Liter Medium PG²⁵_{Vial} zum Einsatz kamen.

In Tabelle 3.8 findet sich die Auflistung der ebenfalls getesteten kommerziell erhältlichen Präparate für mikrobiologische Fermentationsmedien.

Tabelle 3.8: Auflistung alternativer Präparate für mikrobiologische Fermentationsmedien

Komponente	Hersteller
Pflanzenpepton E1 (Kartoffelpepton), Weizenpepton E1, Sojapepton A3 SC	Organotechnie®, S.A.S., La Courneuve, F
Fleischextrakt für die Mikrobiologie , Pepton aus Casein, pankreatisch verdaut	Carl-Rot GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D

3.2.8 Rohglycerinaufbereitung

Für eine Vorbehandlung von Rohglycerin einer kostengünstigen niedrigen Aufarbeitungsstufe bietet sich der Einsatz von Adsorbentien an. Eine der bekanntesten stellt Aktivkohle dar. Bleicherden wie z. B. Bentonit dienen der Entfernung von Oxidationsprodukten, Seifen, Schleimstoffen und Schwermetallspuren im Rahmen der Pflanzenölraffinierung [Zschau 1985; Kaufhold 2001]. Eine weitere Möglichkeit stellt Hydrotalcit dar. Hierbei handelt es sich um ein Magnesium-Aluminium-Hydroxycarbonat, welches nach thermischer Aktivierung in der Lage ist als Anionensorbens bzw. -taucher zu fungieren [Parker et al. 1995]. Silicate, wie z. B. das polare Si60 werden im Bereich der Chromatographie eingesetzt und könnten daher unter Umständen ebenfalls als Adsorber für die Aufarbeitung von Rohglycerin in Frage kommen. Eine andere Herangehensweise stellt der Einsatz von Hefeextraktzellwänden (z. B. Extraferm®) dar. Im Rahmen der Untersuchung stagnierender Weinfermentationen wurde festgestellt, dass diese in der Lage sind mittelkettige Fettsäuren und deren Ester zu adsorbieren [Lafon-Lafourcade et al. 1984]. In dieser Arbeit wurden daher diese Substanzen für die Vorbehandlung von Rohglycerinen eingesetzt.

Zur Aufbereitung wurde das Rohglycerin in Scheidetrichter überführt und die sich innerhalb von 2 Tagen bei Raumtemperatur absetzende Schwimmschicht entfernt. Anschließend wurden 150 mL des Rohglycerins mit 1 g der zu testenden Substanz (siehe Tabelle 3.9) versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur mit Magnetrührstäbchen bei 300 rpm (Variomag® Poly 15, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, WA, USA) gerührt. Nach der Abtrennung der Partikel über Faltenfilter (595 1/2 Faltenfilter Ø 185 mm, Schleicher & Schuell GmbH, Dassel, D) wurde im Bedarfsfall eine Zentrifugation für 10 min bei 8000 g und 20 °C angeschlossen. Vor Verwendung wurde das Hydrotalcit für 2 h bei 550 °C im Muffelofen erhitzt.

Tabelle 3.9: Für Rohglycerinaufbereitung getestete Substanzen

Komponente	Hersteller
Bentonit	Schönebecker Brunnfilter GmbH, Hannover, D
Aktivkohle (Norit PAC 200C)	Norit Nederland B.V., Amersfoort, NL
Hydrotalcit (synthetisch)	Sigma-Aldrich® Corporation, St. Louis, MO, USA
Extraferm®	DSM Food Specialties, Delft, NL
Si60	Sigma-Aldrich® Corporation, St. Louis, MO, USA

3.2.9 Feedlösungen

Für die Feedlösungen der Fed-Batch-Fermentationen wurde Glycerin in der gewünschten Menge vorgelegt, mit Zusatzkomponenten (z. B. Hefeextrakt) versetzt und mit deionisiertem Wasser auf das notwendige Endvolumen aufgefüllt. Sofern nicht anders beschrieben, enthält die Standardfeedlösung 80 % (w/v) Pharmaglycerin und $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Hefeextrakt. Nach dem Autoklavieren für 20 min bei 121°C und 1 bar Überdruck (Tuttnauer 2540 EL, Tuttnauer Europe B.V., Breda, NL) wurden die Feedflaschen zügig entnommen und verschlossen. Eine Ausnahme stellte die Fermentation in 200-L-Maßstab (siehe Kap. 4.9.6) dar, für welche auf das Autoklavieren des Rohglycerinfeeds verzichtet wurde.

3.3 Analytik

3.3.1 Bestimmung der optischen Dichte (OD_{605})

Das Wachstum der Kulturen wurde über die Bestimmung der optischen Dichte kontrolliert. Hierfür wurde mittels Photometer (T80 UV/VIS Spectrophotometer, PG Instruments Limited, Leicester, UK) die Transmission der Bakteriensuspension bei 605 nm gemessen und per Software (UVWin V5.0.5) automatisch in die zugehörige optische Dichte umgerechnet (siehe Gleichung 3-1). Jede Probe wurde doppelt vermessen, wobei Wasser als Referenz diente. Die im Bedarfsfall notwendige Verdünnung der Proben wurde ebenfalls mit Wasser durchgeführt.

Abweichend zu Fermenter- oder Vialversuchen erfolgte für die Versuche im 96-Well-Mikrotitermaßstab die Bestimmung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 550 nm.

$$OD_{605} = -\log_{10}\left(\frac{T_{605}}{100}\right) \cdot f \quad (3-1)$$

T : Transmission bei einer Wellenlänge von 605 nm
 f : Verdünnungsfaktor

3.3.2 Mikroskopie

Zur Betrachtung der Zellmorphologie wurden Proben mit dem Phasenkontrastmikroskop (Axioplan, Carl Zeiss AG, Oberkochen, D) untersucht. Zur Größenbestimmung konnte eine Bildverarbeitungssoftware (analySIS 5.0, Soft Imaging System GmbH, Münster, D) herangezogen werden.

3.3.3 Bestimmung der Biotrockenmasse (BTM)

Für die Bestimmung der Biotrockenmasse wurden 20 mL Zellsuspension in vorgetrockneten, ausgewogenen Aluminiumzentrifugationsröhrchen für 10 min bei 8000 g und 4 °C abzentrifugiert (Biofuge[®] stratos, Heraeus Instruments GmbH & Co. KG, Hanau, D). Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet in 15 mL physiologischer Kochsalzlösung (0,9 % NaCl) resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Nach insgesamt drei Waschschritten erfolgte die Trocknung des Zellpellets bei 105 °C im Trockenschrank (UE400, Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, D). Nach Abkühlung im Exsikkator erfolgte die Bestimmung der Gewichts Differenz (Gleichung 3-2) zwischen dem Gefäß mit bzw. ohne Zellpellet auf der Analysewaage (AnalyticA 200S, Sartorius-Stedim Biotech GmbH, Göttingen, D). Die Ergebnisse der Biotrockenmassebestimmung befinden sich im Anhang (siehe Abbildung 6.2).

$$BTM = \frac{m_{Pellet} - m_{leer}}{V} \quad (3-2)$$

BTM : Biotrockenmasse [g·L⁻¹]
 m_{Pellet} : Gewicht Reaktionsgefäß mit getrocknetem Pellet [g]
 m_{leer} : Gewicht leeres, getrocknetes Reaktionsgefäß [g]
 V : Volumen der Zellsuspension [L]

3.3.4 HPLC

Die qualitative und quantitative Bestimmung der Metabolite erfolgte mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC). Bei der eingesetzten Trennsäule handelte es sich um eine gepackte Säule mit sulfoniertem Polystyren-Divinylbenzen-Copolymer (300 x 7,8 mm Aminex HPX-87H; Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA). Eine zusätzliche Vorsäule (SecurityGuard™ Carbo-H+, Phenomenex, Inc., Torrance, CA, USA) diente dem Schutz der HPLC-Säule. Für die Probenaufgabe wurde eine Probenschleife mit einem Volumen von 20 µL eingesetzt. Die Trennung erfolgte für 30 min mit 0,5 mM Schwefelsäure als Laufmittel bei einer Temperatur von 60 °C und einer Flussrate von 0,7 mL·min⁻¹. Das Trennprinzip der verwendeten HPLC-Säule beruht neben Ionenausschluss und -austausch auch auf Reversed Phase und Größenausschluss. Zur Detektion dienten sowohl ein RI-Detektor als auch ein UV-Detektor bei einer Wellenlänge von 210 nm. Die Hardware-Komponenten des HPLC-Systems finden sich in Tabelle 3.10.

Tabelle 3.10: Komponenten des eingesetzten HPLC-Systems

Komponente	Typ	Hersteller
Interface-Modul	Interface-Box	Wissenschaftliche Gerätebau
Degasser	K-1001 K-5004	Dr. Ing. Herbert Knauer
Pumpe	K-1001	GmbH, Berlin, D
<hr/>		
Autosampler	Basic Marathon	Spark Holland B.V., Emmen, NL
<hr/>		
Säulenofen	655 A-52	Merck-Hitachi, Darmstad, D
<hr/>		
UV-Detektor	SPD-6A	Shimadzu Corporation, Kyoto, J
<hr/>		
RI-Detektor	K-2301	Wissenschaftliche Gerätebau Dr. Ing. Herbert Knauer GmbH, Berlin, D

Die Datenerfassung und Auswertung erfolgte über einen angeschlossenen PC mittels der Software EZChrom Elite (Scientific Instruments Manufacturer GmbH, Oberhausen, D). Bei zu vermessenden Proben wurde zunächst die Biomasse für 10 min bei 20200 g (Centrifuge

5417 R, Eppendorf AG, Hamburg, D) abzentrifugiert. Nach Verdünnung mit 5 mM Schwefelsäure erfolgte im Regelfall die erneute Zentrifugation zur Abtrennung von möglicherweise durch die Ansäuerung ausgefallenen Partikeln (z. B. Proteine). Für die Online-Bestimmung im Rahmen der Fermentationen im Doppelfermentersystem wurden die zellfreien Proben (siehe Abbildung 3.7) unverdünnt aufgegeben. Aufgrund des Beprobungsablaufs dieser Messungen erfolgte eine Limitierung der Laufzeit auf 20 min. Ein Beispielchromatogramm für die Vermessung von Handproben 1,3-Propandiol haltiger Fermentationsbrühe findet sich in Abbildung 3.2.

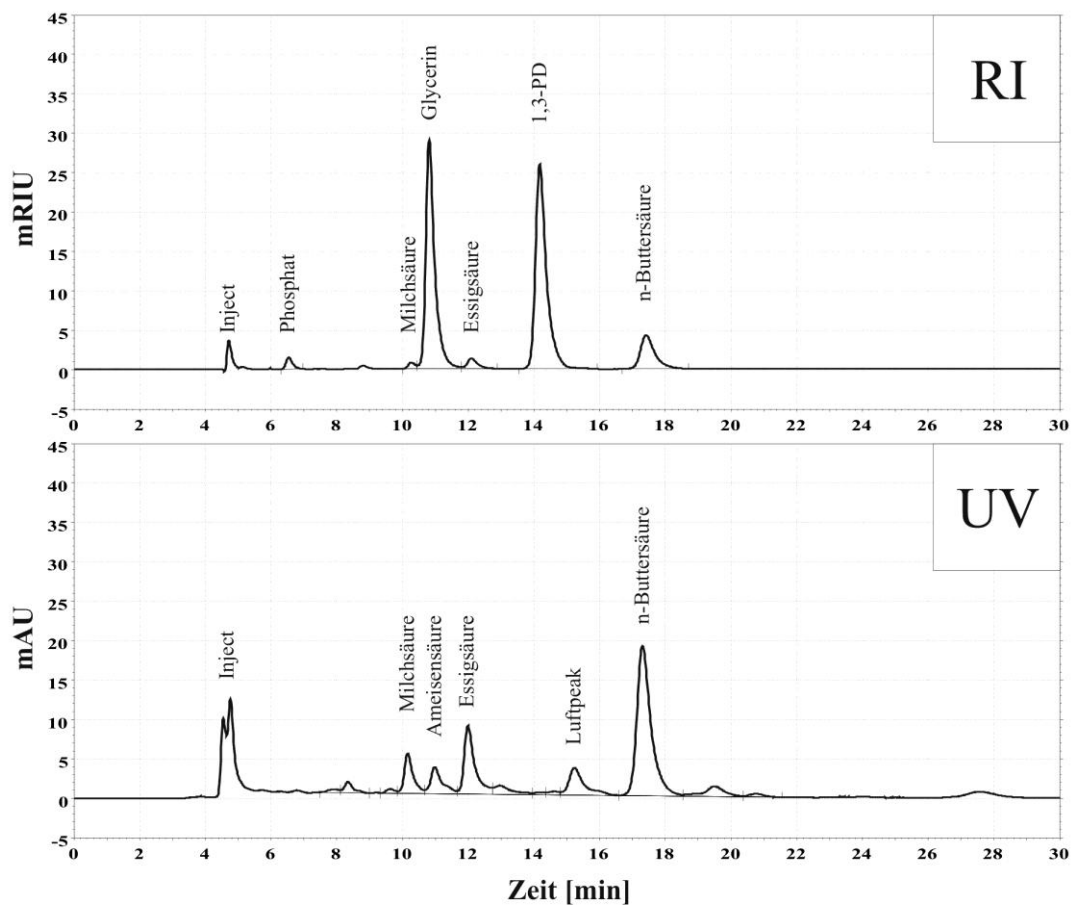


Abbildung 3.2: Beispielhafte HPLC-Chromatogramme von 1,3-PD-haltiger Fermenterbrühe

3.3.5 ICP

Zur quantitativen Bestimmung von Spurenelementen wurden Rohglycerinproben (ca. $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) per ICP-(inductively coupled plasma)-Emmisions-Spektrometer (iCAP 6300 Duo, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, WA, USA) vermessen. Die axiale Messung mit einer Leistung von 1150 W erfolgte nach Kalibration mit Einzelelementstandards (ROTI®STAR,

Carl-Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D). Bei den zur Verfügung stehenden Standards handelte es sich um Ca, Co, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, S, W und Zn.

3.3.6 Stickstoffbestimmung

Der Stickstoffgehalt der Hefeextraktersatzstoffe wurde über eine Bestimmung nach Kjeldahl gemäß den Deutschen Einheitsverfahren DIN EN 25663 (H11) ermittelt. Für jede Probe wurde hierbei eine dreifache Messung durchgeführt. Die Ergebnisse finden sich im Anhang in Tabelle 6.2.

3.4 Anaerobe Medien

3.4.1 Herstellung

Die Chemikalien wurden bis auf L-Cystein-Hydrochlorid gemäß der gewünschten Konzentrationen eingewogen (Kern PB, Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern, D). Nach Einstellung des pH-Wertes wurden die Lösungen in der Mikrowelle (R-202, Sharp Corporation, Osaka, J) auf ca. 80 °C erhitzt. Anschließend erfolgte die Zugabe des L-Cystein-Hydrochlorid und die Überführung in geeignete Laborflaschen. Um möglichst anaerobe Bedingungen zu gewährleisten wurden die PP-Schraubkappen auf der Innenseite zusätzlich mit einem zu der Gewindegröße passendem Septum aus mit PTFE beschichtetem Butylgummi (Glasgerätebau Ochs Laborfachhandel e.K, Bovenden, D) versehen. Nach dem Autoklavieren für 20 min bei 121 °C und 1 bar Überdruck (Tuttnauer 2540 EL, Tuttnauer Europe B.V., Breda, NL) wurden die Laborflaschen zügig entnommen, verschlossen und entweder für eine spätere Verwendung bei 4 °C gelagert oder direkt in die Anaerobierbank eingeschleust. Die eingeschleusten Medien konnten entweder direkt für Versuche im 96-Well-Mikrotitermaßstab eingesetzt werden oder es erfolgte die zeitnahe Abfüllung in Glasvials (Rollrandflaschen). Hierfür wurden zuvor 30 mL- oder 50 mL-Vials mit Alufolie verschlossen, in Autoklavierbeuteln verpackt und zusammen mit passenden Butylgummistopfen (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, D) für 20 min bei 121 °C und 1 bar Überdruck (Tuttnauer 2540 EL, Tuttnauer Europe B.V., Breda, NL) autoklaviert und im Anschluss daran in die Anaerobierbank eingeschleust. Auf diese Weise konnten die sterilen Medien mittels zuvor ebenfalls autoklavierten Dispenser (Fortuna® Optifix® Solvent, Poulten & Graf GmbH, Wertheim, D) unter Stickstoffatmosphäre in die Vials abgefüllt, mit Butylgummistopfen versehen und mit Metallkappen luftdicht

verschlossen werden. Für die Verwendung im Fermentermaßstab wurde das Medium nach dem Erhitzen in die vorbereiteten Fermenter gefüllt und anschließend in diesen autoklaviert. Hierbei entfiel jedoch die Zugabe des L-Cystein-Hydrochlorids. Dessen Zugabe wurde über das Hinzufügen einer sterilen fünfprozentigen (w/v) Lösung (siehe Kap. 3.2.6) ca. eine Stunde vor Fermentationsbeginn realisiert um ein sauerstofffreies Medium zu garantieren.

3.4.2 Anaerobisierungsanlage

Bei Bedarf wurden bereits autoklavierte und mit Aluminiumkappen oder Stopfen verschlossene Medien nachträglich anaerobisiert. Die Entfernung des verbliebenen Sauerstoffs wurde dabei durch das abwechselnde Anlegen eines Vakuums und die anschließende Begasung mit sterilfiltrierten Stickstoff ($0,22\ \mu\text{m}$ Rotilabo[®]-Spritzenfilter, Carl-Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D) erreicht. Das Umschalten zwischen beiden Zuständen erfolgte jeweils nach zwei Minuten und wurde über ein am Institut angefertigtes Steuermodul geregelt, welches ebenfalls die Anzahl der bereits beendeten Zyklen (Vakuum + Begasung) anzeigte. Ein Foto sowie eine schematische Darstellung der verwendeten Anaerobisierungsanlage findet sich in Abbildung 3.3.

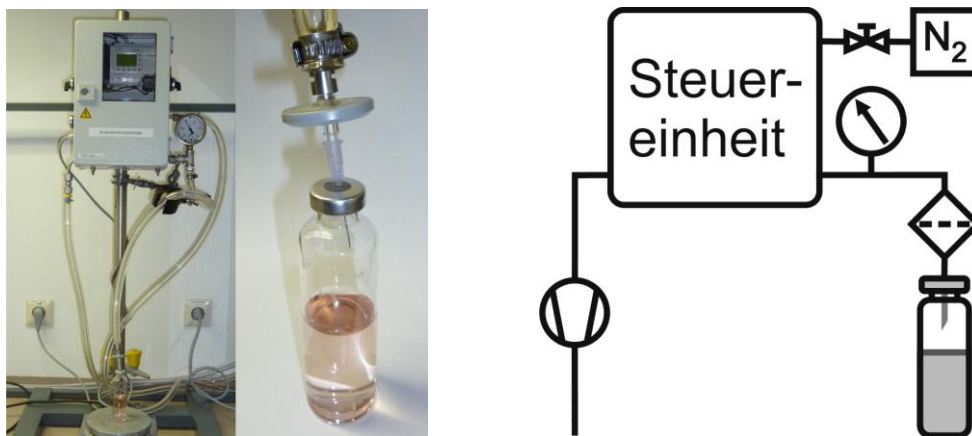


Abbildung 3.3: Foto und Schema Anaerobisierungsanlage

3.5 Kulturen

3.5.1 Kryokulturen

Für die Herstellung der Kryokulturen wurden 20 mL einer Zellkultur ($\text{OD}_{605} \approx 4 - 6$) mit dem gleichen Volumen sterilen Pharmaglycerins versetzt, durchmischt und jeweils ca. 1,5 mL in

sterile Kryoröhrchen überführt. Bis zur weiteren Verwendung erfolgte das Einfrieren und die Lagerung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.5.2 Arbeitskulturen

Zur Herstellung der Arbeitskulturen wurde im Abstand von 3-4 Wochen eine Kryokultur aufgetaut und auf 12 mL steriles, anaerobes Standardvialmedium mit Pharmaglycerin (siehe Kap. 3.2.1) und $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Hefeextrakt ($\text{PG}^{25}\text{HE}^1_{\text{Vial}}$) überimpft und bei $32\text{ }^{\circ}\text{C}$ ruhend im Wasserbad inkubiert. Bei erfolgreichem Anwachsen wurden 1,5 mL dieser Kultur auf 30 mL Medium überimpft, welches wiederum als Ausgangspunkt für die diversen Vorkulturen diente. Parallel dazu wurde die Arbeitskulturen einmal pro Woche auf Standardvialmedium überimpft. Das Übersichtsschema findet sich in Abbildung 3.4.

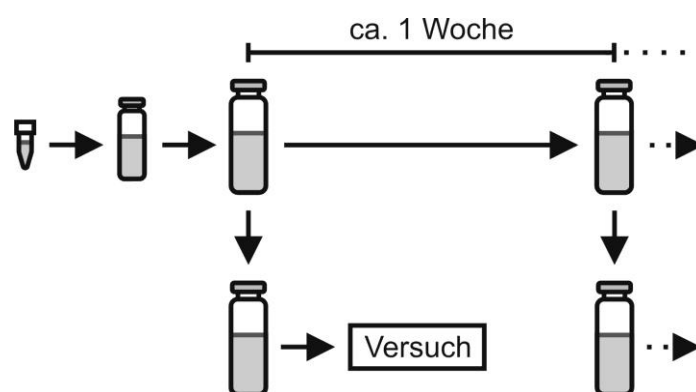


Abbildung 3.4: Herstellung und Überimpfung der Arbeitskulturen

Sofern nicht anderweitig angegeben, wird die Standardvorkultur mit $\text{PG}^{25}\text{HE}^1_{\text{Vial}}$ und die Vorkultur für Versuche mit Hefeextraktersatzstoffen mit $\text{PG}^{25}\text{HE}^{0,1}_{\text{Vial}}$ hergestellt. Kommen verschiedene Glycerine zum Einsatz, so werden sowohl das Medium einer Fermentation als auch das zugehörige Vorkulturmedium mit dem gleichen Glycerintyp (Pharma- bzw. Rohglycerin) angesetzt.

3.6 Versuchsmaßstäbe

3.6.1 96-Well-Mikrotitermaßstab

Bei den Versuchen im 96-Well-Mikrotitermaßstab wurde auf eine Metabolitbestimmung mittels HPLC verzichtet und sich primär auf die Bestimmung der optischen Dichte beschränkt. Die durchgeführten Versuche sind hierbei in zwei Herangehensweisen unterteilt.

Bei einem Teil der Untersuchungen wurde mit einem außerhalb der Anaerobierbank (Toepffer Lab Systems, Göppingen, D) betriebenen Plattenphotometer gearbeitet, während im Projektverlauf auf ein unter anaeroben Bedingungen betriebenes Photometer umgestellt wurde.

Innerhalb der Anaerobierbank wurden die verschiedenen vorbereiteten Medien in autoklavierte, gekammerte Pipettierreservoirs mit 8 Reihen überführt und die sterilen 96-Well-Mikrotiterplatten (SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, D) mit Hilfe einer Mehrkanalpipette (eLINE1200, Biohit Oyj, Helsinki, FIN) und steriler Spitzen befüllt. Zuvor wurde die Temperiereinheit (Heated Control Module, Coy Laboratory Products Inc., Grass Lake, MI, USA) der Anaerobierbank deaktiviert um die Möglichkeit einer unerwünschten Kontamination in Folge der Luftzirkulation auf ein Minimum zu reduzieren. Pro Well wurden 285 μL Medium eingesetzt. Im Anschluss daran erfolgte mittels Öffnungszange die Öffnung der eingeschleusten Glasvials und die Überführung der jeweils gewünschten Vorkultur in separate Pipettierreservoirs. Um eine unnötige Verunreinigung der Anaerobierbank durch den möglicherweise entweichenden Überdruck der Vorkulturen zu vermeiden, wurden vor dem Einschleusen unter der Cleanbench (Herasafe[®], Heraeus Instruments GmbH & Co. KG, Hanau, D) ein Druckausgleich vorgenommen. Die Inokulation der Wells mit 15 μL Kultur erfolgte analog zum Medium mittels Mehrkanalpipette (mLINE100, Biohit Oyj, Helsinki, FIN) und steriler Spitzen.

Für jede Kombination aus Medium und Stamm wurden auf der 96-Well-Mikrotiterplatte 4 parallele Wells angesetzt. Von den insgesamt angefertigten fünf identischen Platten wurden vier mit geschlossenem Deckel im Thermoschüttler (PST-60HL-4, BioSan Ltd., Riga, LV) bei 32 °C und 350 rpm innerhalb der Anaerobierbank inkubiert. Die fünfte Platte diente zur Ermittlung der Startbedingungen. Hierfür wurde diese nach Ausschleusung schnellstmöglich im Plattenphotometer (Easy Reader EAR 400 AT, SLT Labinstrumente GmbH, Salzburg, A) bei einer Wellenlänge von 550 nm vermessen um einen OD-Wert für die Nullprobe zu erhalten. Nach anschließender Zentrifugation der Platte für 20 min bei 20 °C und 3500 g (Rotanta 46R, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, D) wurde der pH-Wert des Überstandes exemplarisch vermessen um kontrollieren zu können, dass nach dem Autoklavieren des Mediums und der Inokulation möglichst vergleichbare Bedingungen für alle Ansätze vorlagen. Der parallele Ansatz mehrerer identischer Platten diente analog zu den Vialversuchen (siehe Kap. 3.6.2) dem Ausschluss eines Sauerstoffeinflusses auf die Messergebnisse. Zu den gewünschten Zeitpunkten erfolgte jeweils die Entnahme, Ausschleusung und Messung der optischen Dichte für eine weitere Platte. Das so entstehende Schema findet sich in Abbildung 3.5.

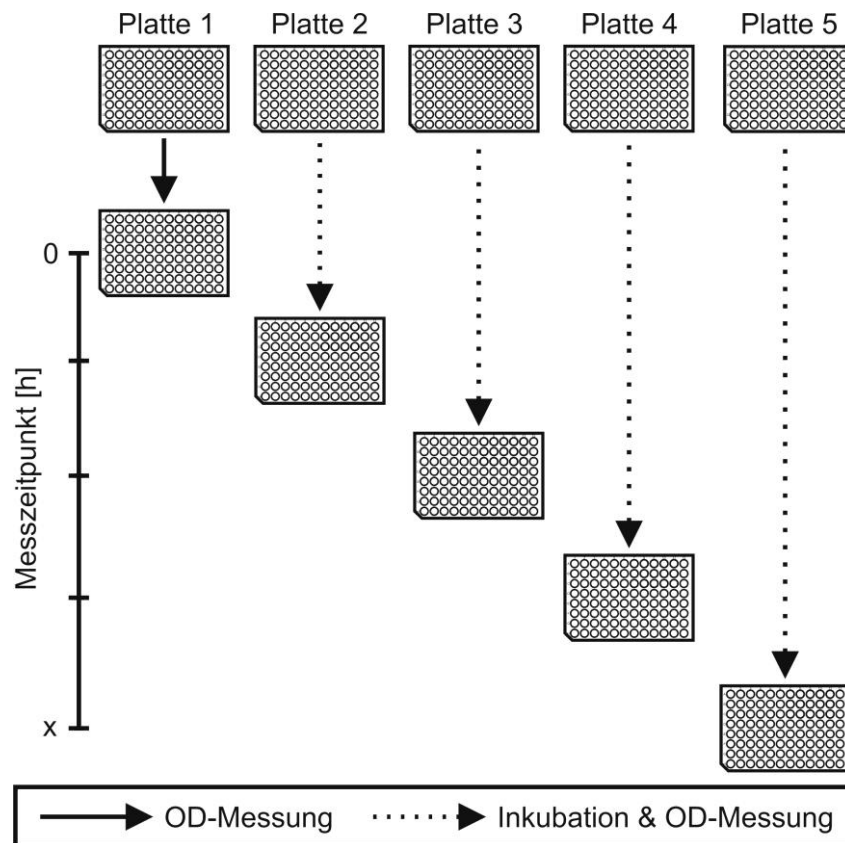


Abbildung 3.5: Beprobungsschema für einen Versuch im 96-Well-Mikrotitermaßstab und externen Plattenphotometer

Die Vor- und Nachteile der getrennten Inkubation und Vermessung findet sich in Tabelle 3.11.

Tabelle 3.11: Vor- und Nachteile der Messung außerhalb der Anaerobierbank

Vorteil	Nachteil
geringer Verdunstungsverlust durch Deckel konstante Temperierung	Probepunkte auf maximal 5 beschränkt großer Aufwand für 5 parallele Platten und deren Ausschleusung

Im fortschreitenden Verlauf der Arbeiten wurde die Durchführung der Versuche umgestellt. Die Vorbereitungen sowie das Befüllen und die Inokulation der 96-Well-Mikrotiterplatten erfolgte hierbei analog zur vorhergehenden Herangehensweise. Jedoch wurden abweichend dazu die parallele Inkubation und Vermessung der optischen Dichte mit Hilfe eines Absorptions-Readers (ELx808TMIU, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) komplett unter anaeroben Bedingungen durchgeführt. Sowohl die Einstellung und Steuerung des

Readers als auch die Datenaufzeichnung erfolgte mit einem außerhalb der Anaerobierbank positionierten Computer über die Software Gen5TM (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA). Hierfür wurde die serielle Schnittstelle des Readers mit einem Bluetooth-Adapter (BlueSerial CL-1, Hantz + Partner GmbH, Gundelfingen i.Br, D) versehen. Der drahtlose Datenaustausch wurde durch die Ausstattung des Computers mit dem korrespondierenden Bluetooth-USB-Adapter (BT-USBMini, Hantz + Partner GmbH, Gundelfingen i.Br, D) ermöglicht.

Alle 30 min erfolgte die Bestimmung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 550 nm, wobei für 10 min unmittelbar vor Beginn der Messung die lineare Schüttelfunktion (Einstellung: slow) des Readers aktiviert wurde. Die Inkubation erfolgte, sofern nicht anders angegeben bei $32\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$. Die Schwankungsbreite der Temperatur ist das Resultat des Wärmeeintrags durch die Lampe und die Schüttelfunktion des Absorptions-Readers in das „geschlossene System“ der Anaerobierbank. Um eine Beeinträchtigung der OD-Messung durch Kondenswasser zu vermeiden, wurden die 96-Well-Mikrotiterplatten ohne Deckel eingesetzt. Durch die resultierende stärkere Verdunstung belief sich die Versuchsdauer auf maximal 24 h. Insgesamt wurden pro Versuch zwei identische Platten befüllt, wobei eine für die fortlaufende Bestimmung der optischen Dichte und der Überstand einer Weiteren (Zentrifugation s.o.) für die Ermittlung der pH-Werte zu Beginn der Messung diene. Für die Datenauswertung wurden die sich in den äußeren horizontalen Reihen befindlichen Wells auf Grund der starken Verdunstung nicht herangezogen. Die dargestellten Werte entsprechen demnach jeweils einem 3-fach Ansatz. Die Vor- und Nachteile dieser Versuchs- bzw. Messanordnung findet sich in Tabelle 3.12.

Tabelle 3.12: Vor- und Nachteile der Messung innerhalb der Anaerobierbank

Vorteil	Nachteil
hohe Anzahl an Messpunkten	starke Verdunstungsverluste
geringer Materialeinsatz	deutlicher Wärmeeintrag durch Lampe und Schüttler in das „geschlossene System“ der Anaerobierbank

3.6.2 Vialmaßstab

Die Inokulation der Vials mit 3,5 – 5 % Vorkultur bzw. deren Beprobung erfolgte nach Desinfektion der Septen mit 70-Vol % Ethanol mittels steriler Injektionsspritzen (B.Braun Melsungen AG, Melsungen, D) unter der Cleanbench (Herasafe®, Heraeus Instruments GmbH & Co. KG, Hanau, D). Dabei erfolgte jeweils unmittelbar vor der eigentlichen Probenahme ein Druckausgleich der beimpften Vials. Um einen negativen Einfluss des eventuell während der Probenahme in die Vials eingetragenen Sauerstoffs auf das Gesamtergebn des Versuches zu vermeiden bzw. minimieren, wurde das in Abbildung 3.6 dargestellte Beprobungsschema angewandt. Die zeitgleich angeimpften Vials wurden hierbei zu verschiedenen Zeitpunkten beprobt um besonders für den Versuchsbeginn unbeeinträchtigte Messwerte zu erhalten. Im dargestellten Beprobungsschema erfolgt die Probenahme zum Messzeitpunkt 0 h nur für die Vials 1 und 2. Am folgenden Messzeitpunkt werden nur die Vials 3 und 4 beprobt usw.

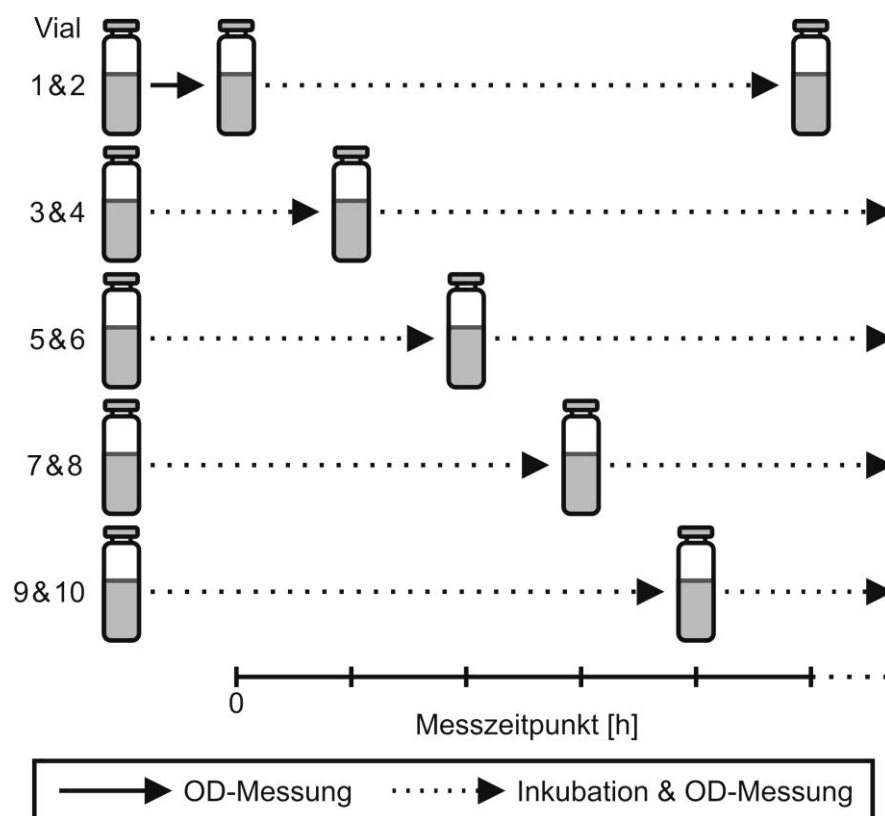


Abbildung 3.6: Beispielhaftes Beprobungsschema für Vialversuche mit jeweils einem Doppelansatz pro Beprobungszeitpunkt

Die entnommen Proben wurden in 1,5 mL Reaktionsgefäße (SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, D) überführt. Nach gründlicher Durchmischung (Vortex Genie 2TM, Bender & Hobein, Zürich, CH) wurde ein Teil der Probe unmittelbar für 10 min bei 20200 g und 4 °C zentrifugiert (Centrifuge 5417 R, Eppendorf AG, Hamburg, D) und für den anderen parallel die optischen Dichte ermittelt (siehe 3.3.1). Vom Überstand der abzentrifugierten Probe wurde der pH-Wert (pH InLab Micro, Mettler Toledo GmbH, Gießen, D) bestimmt und eine Verdünnung zur HPLC-Vermessung hergestellt. Auf Abweichungen vom dargestellten Probenahmeschema wird an entsprechender Stelle verwiesen.

3.6.3 1 L-Doppel-Fermentersystem

3.6.3.1 Aufbau

Das verwendete Doppel-Fermentersystem [Bock 2004] bestand aus zwei doppelwandigen 1 L-Glasgefäßen, welche durch Anschluss an einen Thermostaten (MGW RK20, LAUDA DR. R. Wobser GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, D) temperiert werden konnten. Die Durchmischung wurde durch je einen an einer gasdichten Haltestange (fish-clip®, Bürkle GmbH, Bad Bellingen, D) befestigten magnetischen Rührstab realisiert, welcher mittels Magnetrührer (IKA-COMBIMAG REO, IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, D) angetrieben wurde. Um anaerobe Bedingungen zu gewährleisten erfolgte über Begasungsfritten die Einleitung sterilfiltrierten Stickstoffs (Midisart 2000[®] 0,2 µm, Sartorius-Stedim Biotech GmbH, Göttingen, D), welcher zuvor über einen Sauerstofffilter (GasCleanTM Oxygen Filter, Varian, Inc., Palo Alto, CA, USA) geleitet wurde. Zusätzlich zur Austreibung des produzierten Kohlendioxids verhinderte der so generierte Überdruck das Eindringen von Sauerstoff oder unerwünschter Keime aus der Umgebungsluft. Die Kühlung der Abluft auf ca. 5 °C erfolgte mit Hilfe eines angeschlossenen Kryostaten (Julabo F25, JULABO Labortechnik GmbH, Seelbach, D). Zusätzlich waren die Abluftschläuche nach den Abluftkühlern mit je einem Sterilfilter (Midisart 2000[®] 0,2 µm, Sartorius-Stedim Biotech GmbH, Göttingen, D) und einer Gaswaschflasche verbunden, welche mit niedrig konzentrierter Natronlauge befüllt war um die Geruchsbelastung durch flüchtige organische Säuren zu reduzieren.

Die Bestimmung des pH-Werts erfolgte über autoklavierbare pH-Gelelektroden (PH 405-DPAS-SC-K8S, Mettler Toledo GmbH, Gießen, D), welche an digitale pH-Meter (pH 340i, WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim, D) angeschlossen waren.

Nach Weiterleitung der erhaltenen Messwerte über die integrierten digitalen Datenausgänge an den PC, folgte die Aufzeichnung bzw. Nutzung dieser Daten für die Prozessregelung mittels der Steuerungssoftware DASyLab[®] 9 bzw. 10 (National Instruments Corporation, Austin, TX, USA). Über ansteuerbare Schlauchpumpen (ECOLINE VC-360, ISMATEC SA, Glattbrugg, CH) wurde zum Zwecke der pH-Regelung die Zugabe von Lauge aus externen Vorratsflaschen ermöglicht. Die Zuführung von Glycerin bzw. glycerinhaltiger Feedlösungen aus externen Vorratsflaschen, wurde ebenfalls mit Hilfe von angeschlossenen Schlauchpumpen (ECOLINE VC-360, ISMATEC SA, Glattbrugg, CH) realisiert. Die verwendeten Pumpschläuche aus dem chemisch beständigen, sauerstoff-undurchlässigen Material Norprene[®] (A-60-G bzw. A-60-F, Saint-Gobain Performance Plastics, Charny, Frankreich) hatten dabei einen Innendurchmesser von 0,8 oder 1,6 mm mit einer Wandstärke von 1,6 mm.

Für die Überwachung der Temperatur wurden in die Fermenter ragende, einseitig verschlossene dünnwandige Glasröhrchen nach dem Autoklavieren mit Messfühlern (TFK 325, WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim, D) bestückt. Die Zugabe einer kleinen Menge Wasser sicherte hierbei den besseren Wärmeübergang. Die Temperaturfühler waren parallel zu den pH-Elektroden an den digitalen pH-Metern angeschlossen, wodurch die Temperatur am PC überwacht und gespeichert werden konnte. Digitale Waagen (Kern EW bzw. 510, Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern, D) ermöglichten die gravimetrische Überwachung der Zudosage von Feed und Lauge bei gleichzeitiger Datenübertragung an den PC über die integrierten RS232-Schnittstellen. Analog zu Temperatur und pH erfolgte die Anzeige und Speicherung sowohl aktueller Messwerte als auch von Verlaufskurven mittels DASyLab[®].

Die manuelle Probenahme wurde über einen geschlossenen Schlauchkreislauf (Norprene[®]) realisiert, durch den über eine externe Schlauchpumpe (502S, Watson-Marlow Pumps, Falmouth, UK) Fermenterbrühe gepumpt werden konnte. An einem integrierten Durchgangsventilhahn aus Glas dessen Stopfen durch eine mit einem PTFE beschichteten Butylgummiseptum (Glasgerätebau Ochs Laborfachhandel e.K, Bovenden, D) versehene Lochkappe ersetzt wurde, erfolgte nach Desinfizierung mit 70-Vol % Ethanol die Beprobung mittels steriler Injektionsspritzen (B.Braun Melsungen AG, Melsungen, D). Nach erfolgreicher Entnahme der Probe wurde der Kreislauf durch Umkehrung der Pumprichtung wieder entleert.

Die Sonde für die automatische Probenahme (siehe Abbildung 3.7) [Bock 2004] bestand aus einem speziell gefrästen PEEK-Körper, auf den eine Standard Flow Keramik Membran

(FISP[®], Flownamics[®], Inc., Madison, WI, USA) mit einer maximalen Porengröße von 0,2 µm mittels zweier O-Ringe geschraubt wurde. Der PEEK-Körper wurde mit Hilfe von HPLC-Verschraubungen (Upchurch Scientific[®], IDEX Health & Science LLC, Oak Harbor, WA, USA) mit einer 0,5 mm HPLC-Kapillare verbunden. Über den an deren Ende angebrachten tottraumarmen HPLC-Verbinder (Upchurch Scientific[®], IDEX Health & Science LLC, Oak Harbor, WA, USA) erfolgte der Anschluss des Pumpschlauches über einen entsprechenden passenden Adapter. Auf den PEEK-Körper wurde ein 12 mm Edelstahlrohr aufgeschraubt um die Sonde zu verlängern und den Einbau in die GL25 Gewinde des Fermenters zu ermöglichen. Mittels Schlauchpumpe (ECOLINE VC-360, ISMATEC SA, Glattbrugg, CH) wurde die so erzeugte zellfreie Probe an die angeschlossene HPLC weitergeleitet und ermöglichte die Onlinebestimmung der Metabolit- und Glycerinkonzentrationen (siehe Kap. 3.3.4).

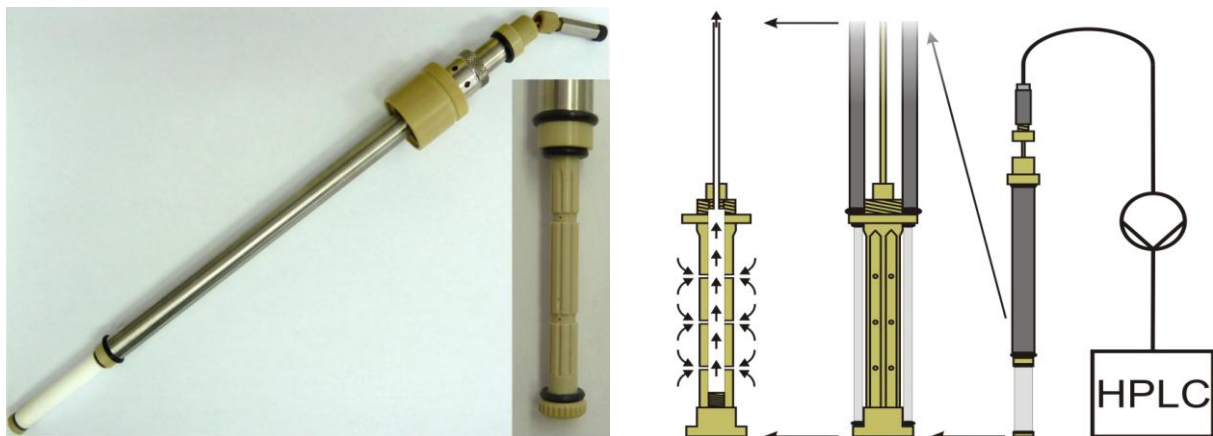


Abbildung 3.7: Foto und Schema der Probenahmesonde mit Keramikmembran

Ein der Pumpe vorgeschaltetes 6-Port-Ventil (WellChrom[®] K-6, Wissenschaftliche Gerätebau Dr. Ing. Herbert Knauer GmbH, Berlin, D) ermöglichte das Umschalten der Beprobung zwischen beiden Fermentern. Die Probenaufgabe erfolgte durch das Umschalten eines der Pumpe folgenden 6-Port-Ventils (WellChrom[®] K-6, Wissenschaftliche Gerätebau Dr. Ing. Herbert Knauer GmbH, Berlin, D) mit 5 µl-Probenschleife. Ein Foto und die schematische Darstellung des verwendeten Doppelfermentersystems finden sich in Abbildung 3.8 und Abbildung 3.9.

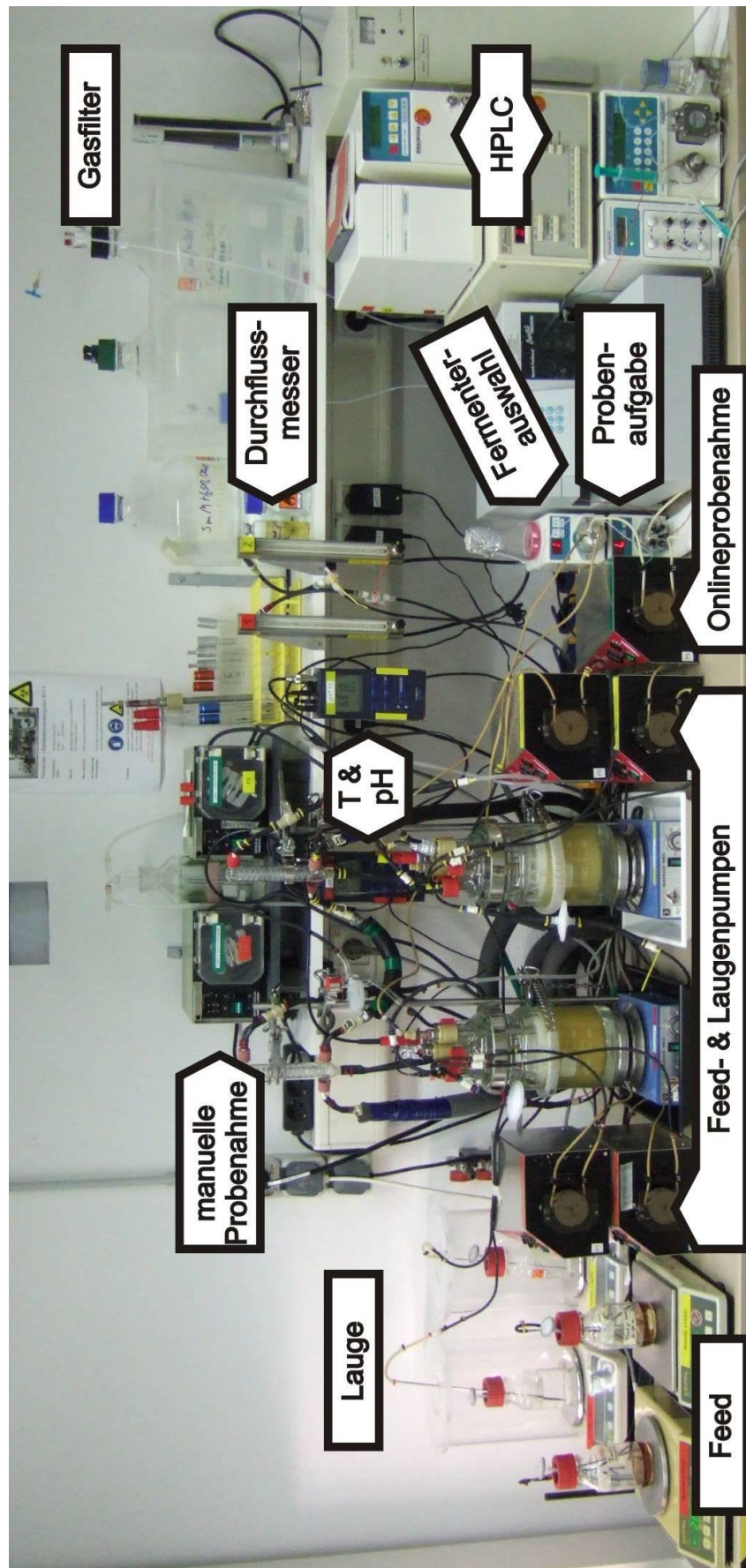


Abbildung 3.8: Foto des Doppelfermentersystems

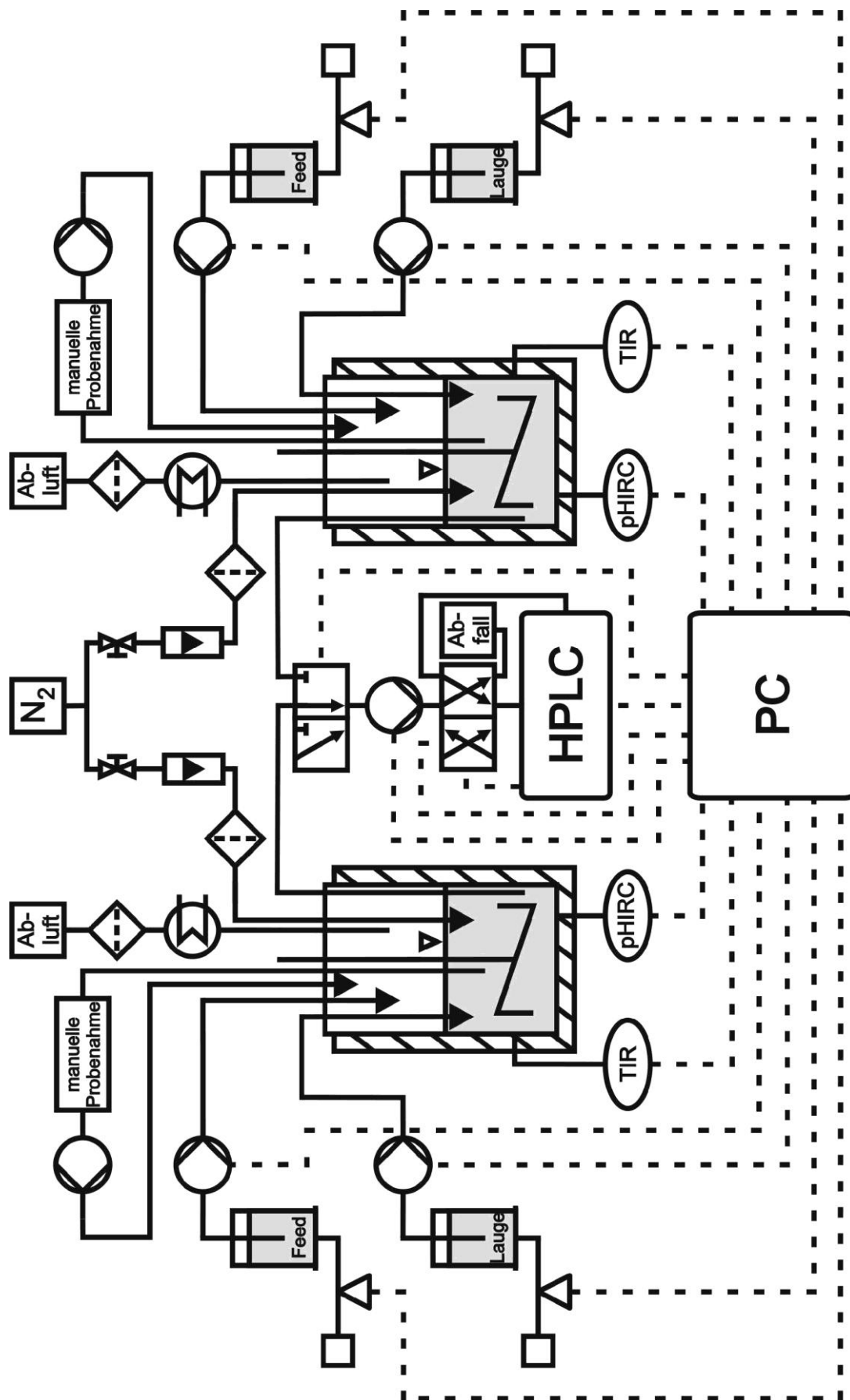


Abbildung 3.9: Schematische Darstellung des Doppelfermentersystems

3.6.3.2 Computersteuerung bzw. –überwachung

Das Grundgerüst des verwendeten Schaltbildes wurde im Rahmen eines Vorläuferprojektes erstellt [Bock 2004] und an die verwendete Hardware angepasst bzw. um neue Funktionen erweitert.

Um einen konstanten pH-Wert zu gewährleisten, wurde der Wert des Eingangssignals mit einem definierbaren Sollwert verglichen. Eine Abweichung führte zu einer kurzzeitigen Aktivierung der Laugenpumpen wobei eine anschließende Zwangspause als Sicherung gegen eine Übertitration diente. Die für die Steuerung der Pumpen benötigten analogen Signale wurden mittels D/A-Wandlerkarte (PCI-6216V, ADLINK Technology Inc., Taipeh, ROK) aus dem von DASYLab[®] ausgegebenen digitalen Signal erzeugt. Der notwendige Kurzschlusskontakt zum Aktivieren bzw. Deaktivieren der Pumpe wurde über eine am Institut gefertigte Schaltung [Bock 2004] realisiert.

Vor dem Start der HPLC-Messung erfolgte das Füllen der Probeschleife des 6-Port-Ventils. Zu diesem Zweck wurde ein siebenminütiger Zyklus der Probenahmepumpe gestartet. Durch einen mehrfachen Wechsel zwischen dem An- bzw. Abschalten der Pumpe sollte dabei eine zu starke Bildung eines Biofilms auf der Membran der Probenahmesonde verhindert werden. Die verwendete HPLC-Software EZChrom Elite (Scientific Instruments Manufacturer GmbH, Oberhausen, D) besaß die Möglichkeit eine programmierte Messung über einen Kurzschlusskontakt zu starten. Da das eingesetzte 6-Port-Ventil über einen solchen verfügte und mit der Interfacebox der HPLC-Anlage verbunden war, löste das durch DASYLab[®] initiierte Umschalten des Ventils auf die Inject-Position somit die HPLC-Messung aus. Die dabei durchlaufene vorprogrammierte Proben-Sequenz bestand dabei abwechselnd aus einer Messung für Fermenter 1 bzw. 2 jeweils unterbrochen von einem „Leerlauf“ zum Spülen der Probeschleife. EZChrom Elite eröffnete die Möglichkeit nach jeder Messung die erhaltenen Ergebnisse in Form einer für DASYLab[®] nicht auslesbaren Datei auszugeben und anschließend ein externes Programm auszuführen. Um die Datenübertragung der HPLC-Ergebnisse an DASYLab[®] zu gewährleisten, kam ein von Ralf Bock geschriebenes Programm (HPLC2DasyLab) [Bock 2004] zum Einsatz, welches aus der von EZChrom Elite erzeugten Datei die Messwerte extrahierte und als durchnummerierte für DASYLab[®] auslesbare ASCII-Dateien ausgab. Über das Datei-Lesen-Modul in DASYLab[®] wurden diese Daten eingelesen und verarbeitet. Jeweils vier Minuten nach Ende der HPLC-Messung wurde das Einlesen gestartet und die Konzentrationen in Form globaler Variablen abgelegt. Für die 1,3-Propandiol-Werte wurde über ein Modul die zugehörige Sollkonzentration an Glycerin bestimmt und bei deren Unterschreitung über ein weiteres Modul die Feed-Zudosage

abhängig von der vorliegenden Abweichung aktiviert. Die Anpassung des Sollwertes für Glycerin war über Handregler in fünf Stufen möglich, wobei die zugehörigen 1,3-Propandiol-Grenzwerte bei 0, 55, 65, 75 bzw. 85 g·L⁻¹ lagen. Der jeweilige angestrebte Glycerinsollwert ergab sich aus der Addition von Einzelwerten jedes Abschnitts. Da aus einer Fehlmessung resultierende zu niedrige Substrat- und Produktkonzentration eine Überfütterung hätten auslösen können, war es möglich über die Entfernung der Einzelwerte bereits überschrittener Stufen (s.o.) aus der Berechnung diesen Effekt zu minimieren. Die angestrebte Glycerinkonzentration lag zu Beginn der Fermentation bei ca. 25 g·L⁻¹. Diese wurde jedoch mit jeder weiteren Überschreitung der Grenzwerte um 3 - 5 g·L⁻¹ gesenkt um einer potenziellen Wachstumshemmung entgegenzuwirken. Weiterhin wurde angestrebt die Glycerinkonzentration zu Fermentationsende möglichst auf null abzusenken, da sich dies positiv auf die Kosten des Rohmaterials und die Aufarbeitung auswirkt. Um einem Glycerinmangel zwischen den zweistündigen Messintervallen der HPLC vorzubeugen, wurde zusätzlich eine Kopplung des Feeds an die Laugen-Zudosage vorgenommen. Bei Aktivierung der Laugen-Pumpen erfolgte die gleichzeitige Aktivierung der Feed-Pumpen. Die Menge wurde dabei über die Geschwindigkeitseinstellung der Pumpen bestimmt.

3.6.3.3 Vorbereitung

Das Fermentergefäß wurde mit Medium sowie allen notwendigen Anbauteilen, inklusive Pumpenschläuchen, Probenahmesonde und kalibrierter pH-Elektrode versehen. Offene Schlauchenden wurden abgeklemmt und mit Aluminiumfolie umwickelt. Der zum Animpfen vorgesehene Schraubdeckel wurde zum Druckausgleich leicht geöffnet und der Fermenter in einen Tischautoklav (CV-EL 18 L GS, CertoClav[®] Sterilizer GmbH, Traun, A) gestellt. Nach dem Aufheizen auf 100 °C erfolgte bei geöffnetem Auslassventil das Austreiben des Sauerstoffs durch Wasserdampf für ca. 3 – 5 min. Anschließend wurde das Auslassventil verschlossen und das Medium für 30 min bei 125 °C und 1 bar Überdruck autoklaviert. Unmittelbar nach einer Abkühlung auf 100 °C und dem Absinken des Überdrucks auf 0 bar wurde der Tischautoklav geöffnet, der Fermenter zügig verschlossen, entnommen und am Fermenterstand an die Temperierung sowie die Stickstoffbegasung angeschlossen. Bei einer konstanten N₂-Begasungsrate von 0,6 L·h⁻¹ und einer Rührerdrehzahl von 400 rpm, erfolgte die Abkühlung auf die standardmäßig verwendete Fermentationstemperatur von 32 °C.

3.6.3.4 Durchführung der Fermentationen

Die Zugabe des Cysteins wurde in Form einer sterilen fünfprozentigen (w/v) Lösung (siehe 3.2.6) ca. eine Stunde vor dem eigentlichen Fermentationsbeginn realisiert um ein sauerstofffreies Medium zu garantieren. Nach Einlegen der Schläuche in Schlauchpumpen und Anschluss an die Vorlagegefäße für Feed (siehe 3.2.1) und Lauge sowie die HPLC wurde das Totvolumen der jeweiligen Schläuche manuell durch Aktivierung der Pumpen gefüllt. Das Inokulum wurde mittels steriler Injektionsspritzen unter der Cleanbench (Herasafe[®], Heraeus Instruments GmbH & Co. KG, Hanau, D) aus den Vorkulturvials entnommen und die Fermenter zügig angeimpft. Parallel erfolgte der Start des notwendigen DASyLab[®] Schaltbildes sowie der HPLC-Software zur Datenaufzeichnung und Regelung. Im Fermentationsverlauf erfolgte eine regelmäßige Beprobung zur Bestimmung der optischen Dichte bzw. Probenvorbereitung für eine spätere offline HPLC-Messung. Nach Zentrifugation der Probe für 10 min bei 20200 g und 4 °C (Centrifuge 5417 R, Eppendorf AG, Hamburg, D) wurde vom Überstand unmittelbar eine Verdünnung zur HPLC-Vermessung hergestellt oder dieser bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert. Im Falle starker Schaumentwicklung wurde mit einer sterilen Einwegspritze das Antischaummittel Struktol[®] J 673 (Schill + Seilacher GmbH, Hamburg, D) zudosiert. Sofern nicht anders erwähnt wurde für die pH-Regelung (pH 7) 10 M NaOH verwendet.

3.6.3.5 Abbruch

Mit Erreichen des Versuchsendes wurde die Datenerfassung gestoppt, die Probenahmesonden entfernt und die Fermenter samt Anbauteilen nach der Sterilisation gereinigt. Die Probenahmesonden wurden mit 70-Vol % Ethanol desinfiziert und zur Reinigung für mindestens eine Stunde mit 1 M NaOH im Gegenstrom gespült.

3.6.4 0,5 L-Fermentation

3.6.4.1 Aufbau

Das verwendete System bestand aus einem 0,5 L-Doppelwandgefäß welches über einen Thermostaten (Julabo F30 Ultratemp 2000, JULABO Labortechnik GmbH, Seelbach, D) auf 32 °C temperiert wurde. Im Rahmen der Begasung mit sterilfiltriertem Stickstoff (Midisart 2000[®] 0,2 µm, Sartorius-Stedim Biotech GmbH, Göttingen, D) erfolgt der Verzicht auf einen zusätzlichen Sauerstofffilter. Die Abluft wurde analog zum Doppelfermentersystem nach der

Kühlung (Julabo F25, JULABO Labortechnik GmbH, Seelbach, D) sterilfiltriert (Midisart 2000[®] 0,2 µm, Sartorius-Stedim Biotech GmbH, Göttingen, D) und durch eine Gaswaschflasche geleitet. Die pH-Messung erfolgte mit Hilfe einer autoklavierbaren pH-Gelelektrode (PH 405-DPAS-SC-K8S, Mettler Toledo GmbH, Gießen, D). Die für die Regelung auf pH 7 notwendige Zugabe von 10 M NaOH aus einem externen Vorratsgefäß wurde mittels einer Regel- und Steuereinheit der meredos GmbH bewerkstelligt. Eine Waage (Kern 440-47N, Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern, D) erlaubte zusätzlich die Kontrolle des Laugenverbrauchs. Die ausschließlich manuelle Probenahme wurde analog zum Doppel-fermentersystem aus einem geschlossenen Kreislauf durchgeführt, durch welchen die Fermenterbrühe gepumpt wurde (101U, Watson-Marlow Pumps, Falmouth, UK). Zur Überwachung der Temperatur diente der Temperaturfühler (GTF 1400 B) eines digitalen Thermometers (GPRT 1400 AN, GREISINGER electronic GmbH, Regenstauf, D). Ein Foto und der schematische Aufbau des Fermentersystems finden sich in Abbildung 3.10 und Abbildung 3.11.

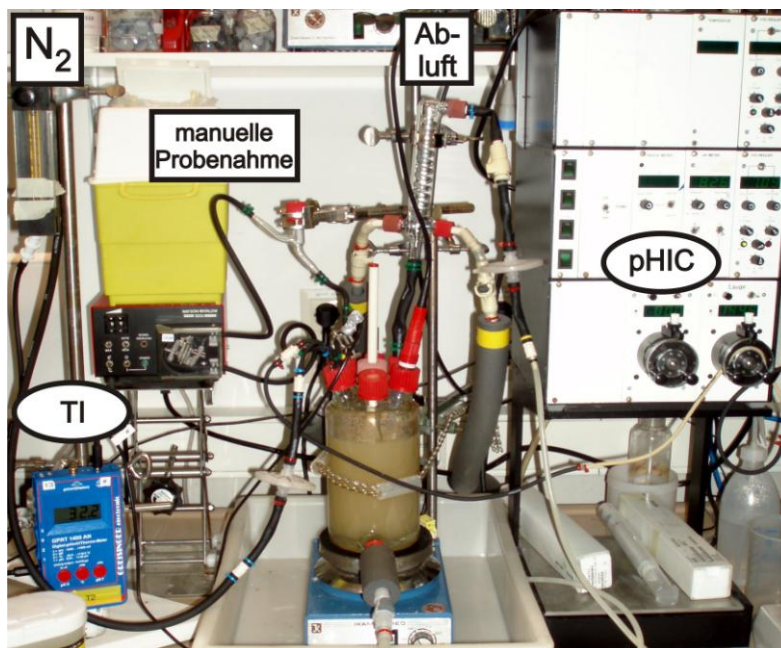


Abbildung 3.10: Foto des 0,5 L-Fermentersystems

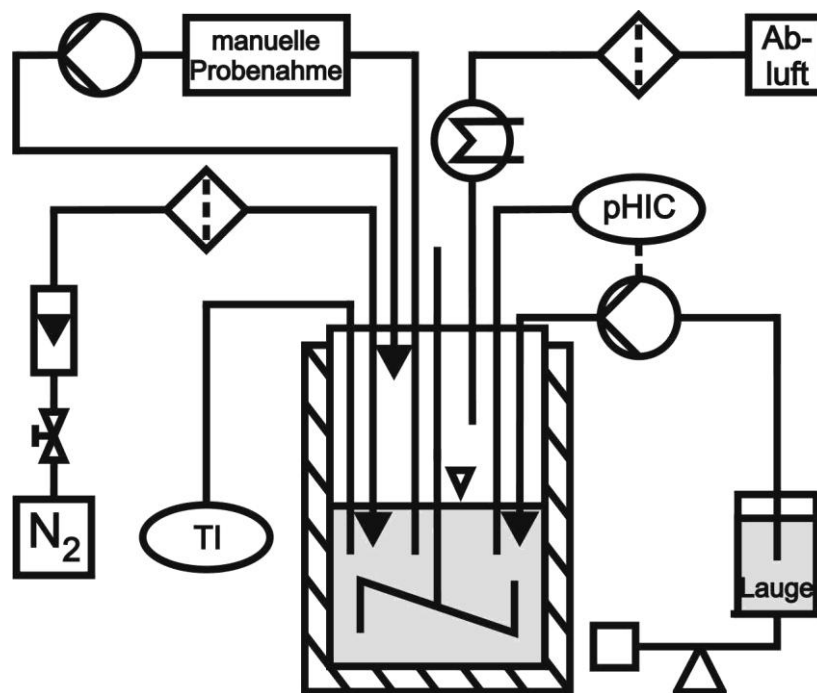


Abbildung 3.11: Schematische Darstellung des 0,5 L-Fermentersystems

Vorbereitung, Durchführung und Abbruch der Fermentation entsprechen den für das Doppelfermentersystem beschriebenen Schritten (siehe Kap. 3.6.3.3 bis Kap. 3.6.3.5).

3.6.5 10 L-Fermentation

3.6.5.1 Aufbau

Das verwendete Fermentersystem Biostat E (Braun Biotech International GmbH, Melsungen, D) bestand aus einem Glaskulturgefäß mit einem maximalen Volumen von 15 Litern, einem mechanischem Rührwerk (3 Scheibenrührer) sowie einem Modul zur Temperierung über die im Fermenterinneren gelegenen Schlaufen. Die Regelung sowohl des pH-Wertes als auch der Temperatur sowie die Zugabe von Lauge aus einer externen Vorratsflasche erfolgte über die ebenfalls zum Fermentersystem gehörige Schalttechnik. Zur Kontrolle und Aufzeichnung prozessrelevanter Parameter stand neben der fermentereigenen Anzeige ein angeschlossener PC mit DASyLab[®] 9 zur Verfügung. Zur Aufrechterhaltung anaerober Bedingungen erfolgte eine konstante Begasung mit sterilfiltriertem Stickstoff (Midisart 2000[®] 0,2 µm, Sartorius-

Stedim Biotech GmbH, Göttingen, D). Die Verifizierung des anaeroben Milieus wurde über die Bestimmung des Gelöstsauerstoffs mittels einer optischen pO_2 -Elektrode (OIM-PSt3-D12/L120-L2.5) und zugehörigem Transmitter (Fibox 3, PreSens – Precision Sensing GmbH, Regensburg, D) durchgeführt. Eine Lichtleiter-Trübungsmesssonde (AF 44 S) samt Trübungsmessgerät (AS 82, Aquasant Messtechnik AG, Bubendorf, CH) ermöglichte die kontinuierliche Überwachung des Wachstums. Bei den weiteren Anbauteilen handelte es sich um eine autoklavierbare pH-Gelelektrode (PH 405-DPAS-SC-K8S/120, Mettler Toledo GmbH, Gießen, D), eine Redox-Gelelektrode (Pt4805-DPAS-SC-K8S/120, Mettler Toledo GmbH, Gießen, D) sowie einen pT100-Temperaturfühler. Mittels einer Schlauchpumpe (REGLO Digital, ISMATEC SA, Glattbrugg, CH) konnte über programmierbare Zyklen Feedlösung zudosiert werden. Ein Foto und der schematische Aufbau des Fermentersystems finden sich in Abbildung 3.12 und Abbildung 3.13.

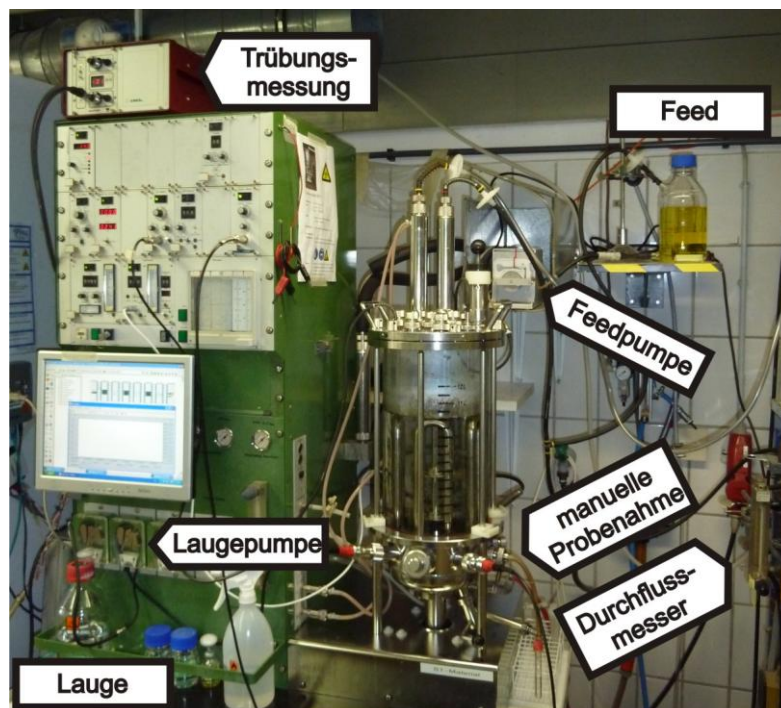


Abbildung 3.12: 10 L-Fermentersystem

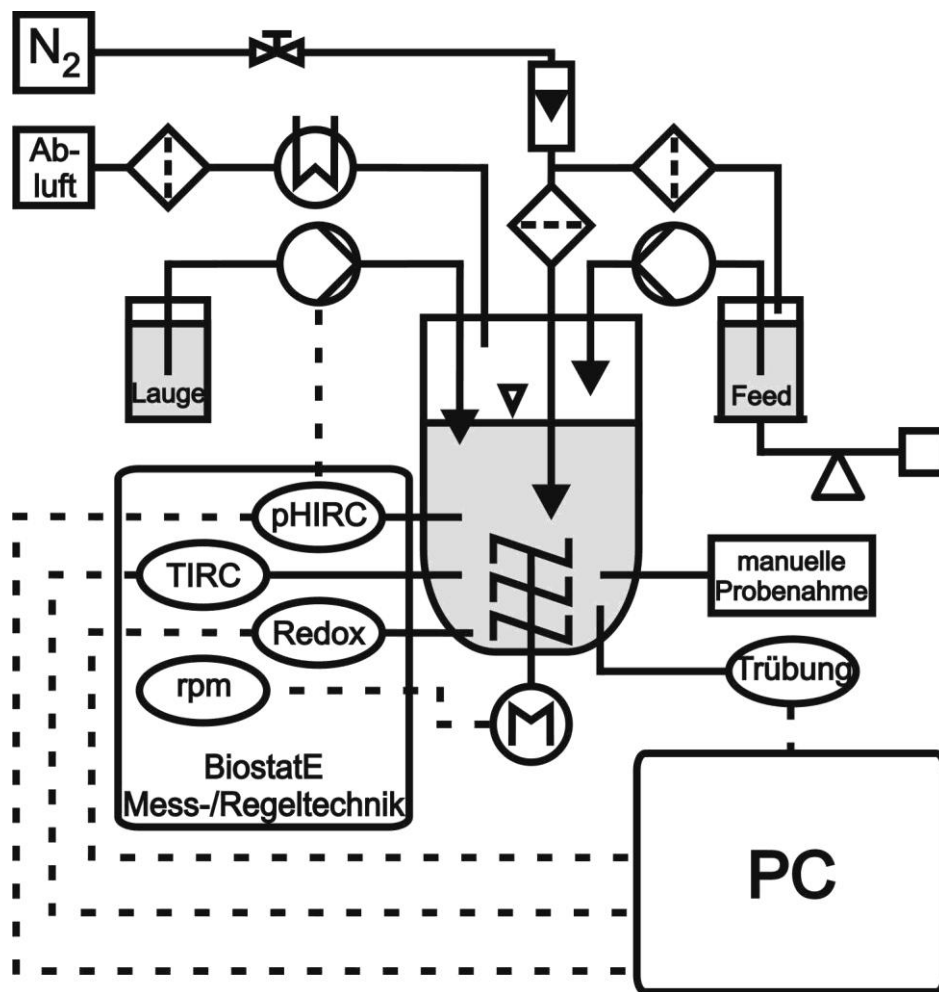


Abbildung 3.13: Schematische Darstellung des 10 L-Fermentersystems

3.6.5.2 Vorbereitungen

Vor dem Anbau der Komponenten erfolgte die Kalibrierung der Sauerstoff- und pH-Elektrode. Anschließend wurde das Kulturgefäß mit Temperaturfühler, Sauerstoff-, pH- und Redox-Elektrode und Lichtleiter-Trübungsmesssonde versehen sowie das Kulturmedium vorgelegt. Anschließend erfolgte die Sterilisierung des Fermenterinhalt für 20 min bei 121 °C, 1 bar Überdruck und einer Rührerdrehzahl von 130 rpm. Nach dem Abkühlen auf die voreingestellte Betriebstemperatur von 32 °C wurde der Rückflusskühler der Ablufteinheit an die Kühlwasserversorgung angeschlossen und die Rührerdrehzahl auf 150 rpm erhöht sowie die Stickstoffbegasung mit ca. 7 L·h⁻¹ gestartet. Anschließend folgte die aseptische Installation der separat autoklavierten und mit Sterilfiltern (Midisart 2000® 0,2 µm, Sartorius-Stedim Biotech GmbH, Göttingen, D) versehenen Zu- und Ablufteinheiten sowie der sterilen Laugen- bzw. Feedzudosage und Probenahmevorrichtung. Über beidseitig abschließende

Schnellkupplungen (neoLab[®], Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg, D) wurde der Feedschlauch mit der Feedflasche (siehe Medien) verbunden und diese an einem zweiten mit einem Sterilfilter versehenen Stutzen mit Stickstoffdruck überlagert. Diese Konstruktion machte ebenfalls einen schnellen und aseptischen Wechsel der Feedflasche möglich.

3.6.5.3 Durchführung der Fermentationen

Die 300 mL Vorkulturen wurden in einer 500 mL Glasflasche inkubiert, welche über zwei Stutzen verfügte. Der Stutzen am Flaschenhals war hierbei mit einem Sterilfilter (Midisart 2000[®] 0,2 µm, Sartorius-Stedim Biotech GmbH, Göttingen, D) versehen und der Stutzen im Bereich des Flaschenbodens mit einer Animpfgarnitur. Nach Inkubation im Wasserbad bei 32 °C wurde die abgeflamnte sterile Animpfgarnitur zügig über ein Septum in den Fermenterdeckel geschraubt, die Flasche über den Sterilfilter mit Stickstoffdruck überlagert und das Inokulum in den Fermenter laufen gelassen. Anschließend wurden sowohl die Datenaufzeichnung (DASYLab[®]) als auch die pH-Regelung aktiviert. Im Fermentationsverlauf erfolgte eine regelmäßige manuelle Beprobung über die angebrachte Probenahmevorrichtung. Diese Proben dienten sowohl der Bestimmung der optischen Dichte als auch der Vorbereitung für die HPLC-Vermessung (siehe Kap. 3.3.4.). Einer starken Schaumentwicklung konnte mit der Zugabe eines sterilen Antischaummittels entgegengewirkt werden. In Abhängigkeit der ermittelten Produkt- bzw. Substratkonzentrationen wurden die Zyklen der Feedpumpe festgelegt um eine konstante Versorgung mit Glycerin zu gewährleisten. Hierbei wurde angestrebt die Glycerinkonzentration mit fortschreitender Fermentationsdauer bis auf Null zu reduzieren.

3.6.5.4 Abbruch

Auf den Abbruch der Fermentation, den Stopp der Datenerfassung und dem Abbau druckempfindlicher Anbauteile (z. B. Lauge- und Feeddosage) folgte die Sterilisation der Kulturbrühe im Fermenter für 20 min bei 121 °C und 1 bar Überdruck. Nach dem Entfernen der Kulturbrühe erfolgte die Reinigung der Messsonden sowie des Kulturgefäßes.

3.6.6 200 L-Fermentation

3.6.6.1 Aufbau

Das verwendete Fermentersystem Pilot-Fermenter Typ P (Bioengineering AG, Wald, CH, Standort: Institut für Biochemie und Biotechnologie der TU-Braunschweig) bestand aus einem 450 L-Edelstahl-Reaktorbehälter mit einem maximalen Arbeitsvolumen von 300 Litern, einem mechanischem Rührwerk (3 Schrägblattrührer) sowie einer Temperiereinheit. Die Regelung sowohl des pH-Wertes (pH 7) als auch der Temperatur (32 °C) sowie die Zugabe von 10 %iger (w/w) Ammoniaklösung aus den Vorratsbehältern erfolgte über die zum Fermentersystem gehörige Schalttechnik. Die Glycerinzugabe aus externen Behältern wurde über eine Schlauchpumpe (502S, Watson-Marlow Pumps, Falmouth, UK) realisiert. Diese war zusätzlich mit einer analogen Steckdosen-Zeitschaltuhr versehen, welche die Voreinstellung von Pumpzyklen ermöglichte. Über die Einstellung der Pumpzeit und –geschwindigkeit konnten so die gewünschten Glycerinmengen zugeführt werden. Ein Foto und der schematische Aufbau des Fermentersystems finden sich in Abbildung 3.14 und Abbildung 3.15.



Abbildung 3.14: Pilot-Fermenter Typ P

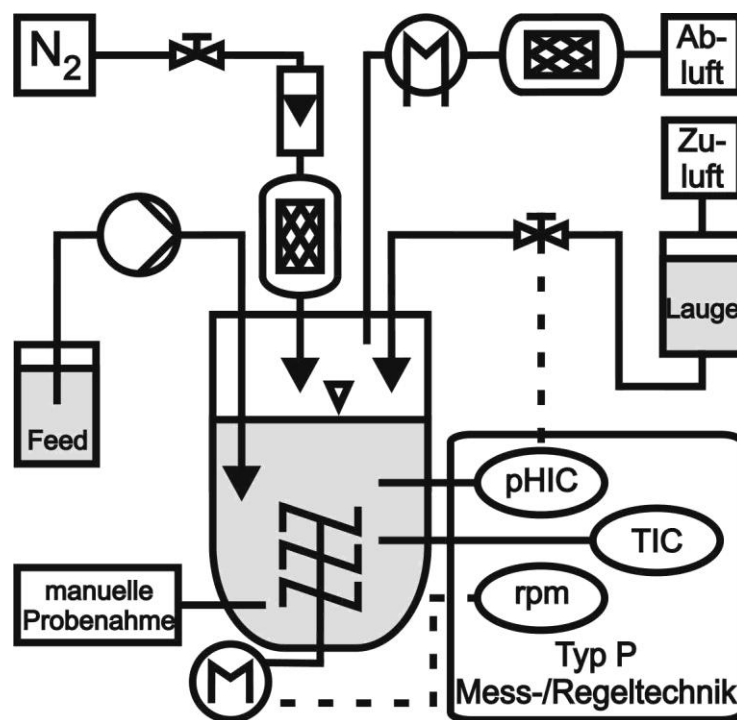


Abbildung 3.15: Vereinfachte schematische Darstellung des Pilot-Fermenter Typ P

3.6.6.2 Vorbereitungen

Vor der Inbetriebnahme erfolgten die Kalibrierung und der Einbau der pH-Elektrode. Nach Vorlage von etwas Wasser wurden die zuvor eingewogenen Chemikalien in den Fermenter überführt und mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 140 L aufgefüllt. Anschließend erfolgte die Dampfsterilisierung des Fermenterinhalt für 25 min. Nach dem Abkühlen auf eine Temperatur von ca. 80 °C wurde die Stickstoffbegasung mit ca. 30 L·h⁻¹ gestartet und eine Rührerdrehzahl von 50 rpm eingestellt.

3.6.6.3 Durchführung der Fermentationen

Die Kultivierung der Vorkultur erfolgte als pH-geregelter Batch im 10 L-Maßstab (siehe Kap. 3.6.5). Nach dem Erreichen einer OD₆₀₅ von ca. 5 - 6 wurde der Fermenterinhalt unter aseptischen Bedingungen in zwei mit Animpfgarnituren versehene 5 L-Flaschen überführt, welche zuvor autoklaviert und mit sterilem Stickstoff (Midisart 2000® 0,2 µm, Sartorius-Stedim Biotech GmbH, Göttingen, D) begast wurden. Die abgeflammt sterilisierten Animpfgarnituren wurden zügig in den Deckel des Fermenters geschraubt und das Inokulum (6 % v/v) in den Fermenter überführt sowie die pH-Regelung aktiviert. Ca. eine Stunde vor dem Inokulieren erfolgte die Zugabe von 440 mL einer sterilen fünfprozentigen (w/v)

Cysteinlösung (siehe Kap. 3.2.6). Eine manuelle Beprobung über die fermentereigene Probenahmevorrichtung erlaubte die regelmäßige Bestimmung der optischen Dichte bzw. Probenvorbereitung für die HPLC-Vermessung. In Abhängigkeit der ermittelten Produkt- bzw. Substratkonzentrationen wurde über die Einstellung der Zeitschaltuhr (siehe Kap. 3.6.6.1) der Glycerinfeed so geregelt, dass eine ausreichende Versorgung mit Glycerin gewährleistet werden konnte.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Stammauswahl nach konventionellem Screening (Screening 1)

Im Rahmen des Screenings nach natürlichen 1,3-Propandiol-Produzenten erfolgte die Isolierung von Mikroorganismen aus Palmölkompost im Rahmen eines konventionellen Screenings [Ringel 2012]. Als Hauptkriterien für eine Vorauswahl potenzieller Produktionsstämme diente hierbei sowohl eine hohe 1,3-Propandiol-Bildung als auch eine hohe (Roh-) Glycerin- und Produkttoleranz. Bei den ausgewählten Stämmen (AKR 12, AKR 17a, AKR 17b, AKR 20 und AKR 29) handelt es sich um gram-positive Sporenbildner (Aminopeptidase-Nachweis). Deren Produktionseigenschaften wurden unter Standardbedingungen ($\text{PG}^{25}\text{HE}^5$, pH 7, 32 °C) auf Pharmaglycerin im Fed-Batch Verfahren (1 L-Maßstab) überprüft. Als Feed diente eine 80 % (w/v) Pharmaglycerinlösung mit 40 g·L⁻¹ Hefeextrakt. Die erhaltenen Ergebnisse finden sich in Tabelle 4.1 und Abbildung 4.1. Für die Darstellung bzw. Berechnung wurde der Zeitpunkt gewählt ab dem keine signifikante Änderung der Produktkonzentration mehr erreicht wurde.

Tabelle 4.1: Endkonzentrationen von 1,3-PD und Glycerin sowie Produktivitäten und Ausbeuten für Fed-Batch Fermentationen konventionell gescreenter Stämme

	AKR 12	AKR 17a	AKR 17b	AKR 20	AKR 29
Zeit [h]	29,5	36,0	35,0	40,0	33,0
1,3-PD_{end} [g·L⁻¹]	80,7	87,7	63,4	75,4	80,1
Glycerin_{end} [g·L⁻¹]	16,2	7,8	10,7	8,5	10,6
Q_{ges} [g_{1,3-PD}·L⁻¹·h⁻¹]	2,7	2,4	1,8	1,9	2,4
Q_{max} [g_{1,3-PD}·L⁻¹·h⁻¹]	6,1	5,6	2,4	3,8	5,2
Y [g_{1,3-PD}·g_{Gly}⁻¹]	0,522	0,531	0,533	0,566	0,546
Y [mol_{1,3-PD}·mol_{Gly}⁻¹]	0,632	0,643	0,645	0,686	0,662

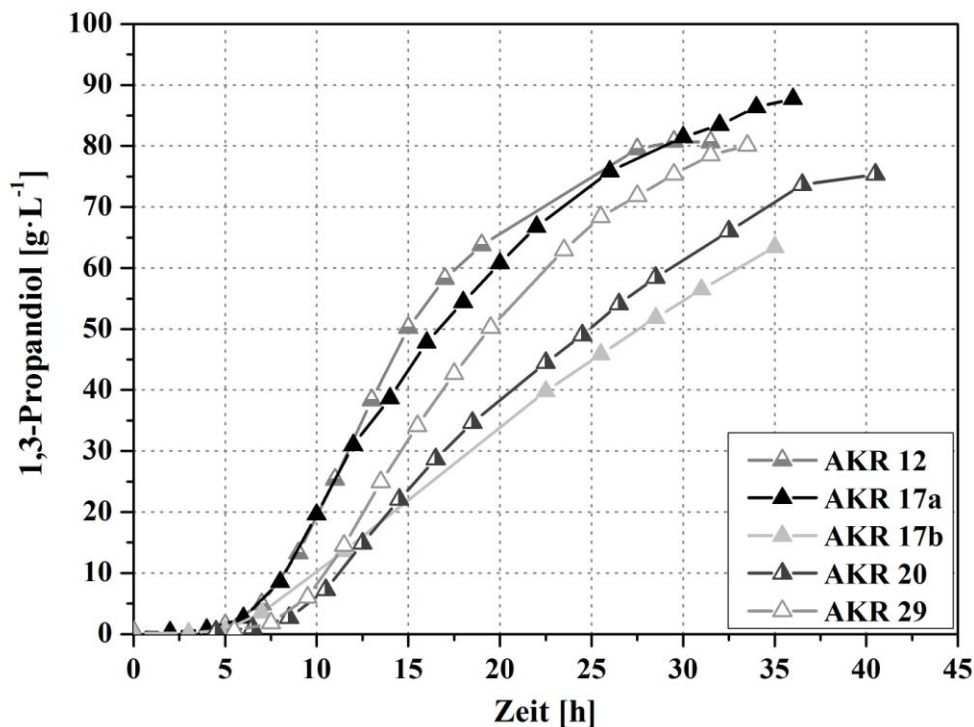


Abbildung 4.1: 1,3-PD-Konzentrationen für Fed-Batch Fermentationen der konventionell gescreenten Stämme AKR 12, 17a, 17b, 20 und 29

Die mit AKR 17b unter den gewählten Bedingungen erzielte 1,3-PD-Konzentration von $63,4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ mit einer Produktivität von $1,8 \text{ g}_{1,3\text{-PD}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ stellt die im Vergleich niedrigsten Werte dar. Der bei Nutzung von AKR 20 erreichten höchsten Ausbeute von $0,686 \text{ mol}_{1,3\text{-PD}} \cdot \text{mol}_{\text{Gly}}^{-1}$ steht wiederum eine verhältnismäßig geringe Endkonzentration von $75,4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 1,3-PD sowie die niedrigste Rohglycerintoleranz [Ringel 2012] gegenüber. AKR 29 zeigt eine gute Produktivität und 1,3-PD-Konzentration besitzt jedoch eine vergleichsweise lange lag-Phase. AKR 12 zeichnet sich sowohl durch eine kurze lag-Phase als auch die höchste Produktivität aus. Jedoch kommt es im Fermentationsverlauf zu einer sehr starken Schaum- und Schleimbildung, welches die Prozessführung deutlich erschwert. Des Weiteren ist die Produktbildung auf $80,7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 1,3-PD limitiert und die Ausbeute mit $0,632 \text{ mol}_{1,3\text{-PD}} \cdot \text{mol}_{\text{Gly}}^{-1}$ die niedrigste aller getesteten Stämme. Die mit AKR 17a erreichte 1,3-PD Konzentration liegt bei $87,7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ und ist damit die höchste im Vergleich. Neben der hohen Produktivität sind seine mit AKR 12 vergleichbar kurze lag-Phase bei gleichzeitig deutlich geringerer Schaum- und Schleimbildung weitere positive Eigenschaften. Weiterhin zeigt der Stamm AKR 17a die beste Rohglycerintoleranz aller im Fermentationsmaßstab getesteten Stämme. Auf Grund der erhaltenen Ergebnisse wurde daher AKR 17a als vielversprechendster Produktionsstamm für weitere Experimente ausgewählt.

4.2 Optimierung der Kultivierungsbedingungen (AKR 17a)

Sowohl die im Rahmen der Stammauswahl gewählte Hefeextrakt- als auch Glycerinkonzentration wurden auf ihr Optimierungspotenzial hin überprüft um z. B. eine Verkürzung der lag-Phase zu erreichen.

4.2.1 Startkonzentration von Hefeextrakt

Im 96-Well-Mikrotitermaßstab wurde das Wachstum auf $\text{PG}^{25}\text{HE}_{\text{Vial}}^{\text{X}}$ mit unterschiedlichen Startkonzentrationen an Hefeextrakt untersucht. Das Hauptaugenmerk lag hierbei auf der Zunahme der optischen Dichte während der ersten Stunden nach dem Animpfen. Die Verläufe der optischen Dichten finden sich in Abbildung 4.2.

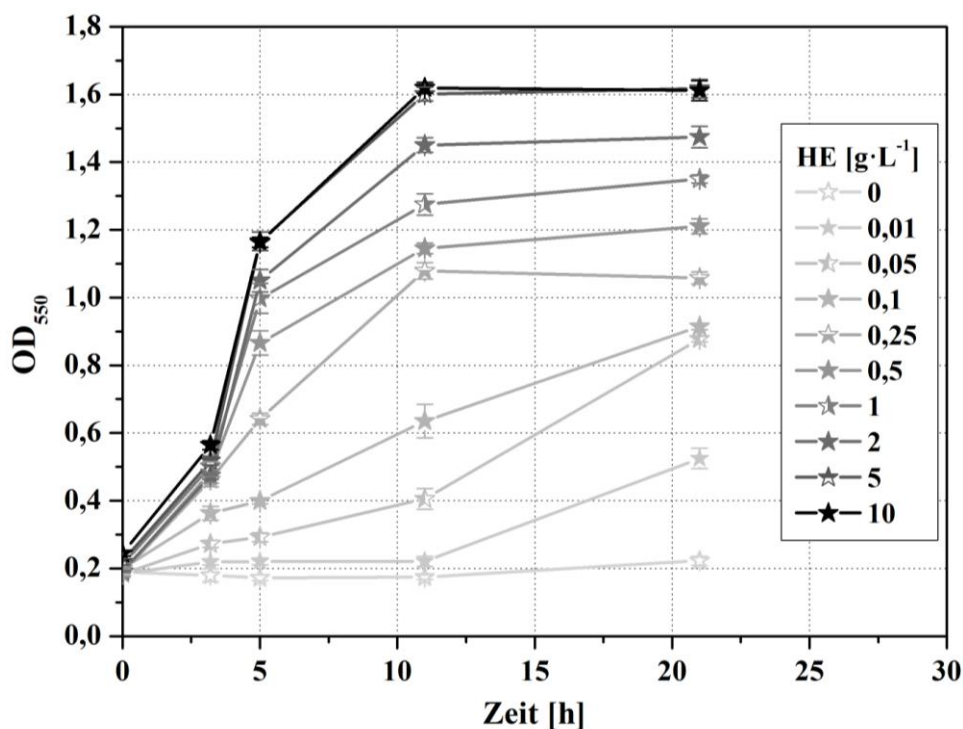


Abbildung 4.2: Entwicklung OD_{550} bei Kultivierung von AKR 17a auf $\text{PG}^{25}\text{HE}_{\text{Vial}}^{\text{X}}$ mit verschiedenen Hefeextraktstartkonzentrationen im 96-Well-Mikrotitermaßstab

Der Versuch zeigt, dass mit steigender Hefeextraktstartkonzentration tendenziell ein verstärktes Wachstum einhergeht. Dabei wird jedoch deutlich, dass bis ca. 3 Stunden kein erheblicher Unterschied der Zunahme der optischen Dichte für Konzentrationen von 0,25 bis $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Hefeextrakt zu beobachten ist. Im weiteren Verlauf ist eine stärkere Abhängigkeit

des Wachstums vom Hefeextrakt zu erkennen. Bei der Betrachtung der Ergebnisse ist zu beachten, dass vor der photometrischen Vermessung der Platte keine zusätzliche Verdünnung der Proben durchgeführt wurde. In Folge der sich absetzenden Biomasse bzw. dem Verlassen des linearen Bereiches ist davon auszugehen, dass ab einer OD_{550} von ca. 1,4 keine verlässlichen Aussagen mehr gemacht werden können. Auffällig ist jedoch, dass eine Verdoppelung der Hefeextraktkonzentration von 5 auf $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ unter den gewählten Testbedingungen während der ersten 5 Stunden keine Beschleunigung des Wachstums mehr bewirkt. Auf Grund der erhaltenen Ergebnisse wurde die Startkonzentration für Fed-Batch Fermentationen bei $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ belassen. Für den 96-Well-Mikrotitermaßstab wurde eine Hefeextraktkonzentration von $2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ festgelegt, um im Rahmen der versuchsbedingt begrenzten Zeit (siehe Kap. 3.6.1) ein schnelles Wachstum bei gleichzeitig reduziertem Materialeinsatz zu erzielen.

4.2.2 Startkonzentration von Glycerin

Für die festgelegte Hefeextraktstartkonzentration von $2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ wurde das Wachstum auf verschiedenen Pharmaglycerinstartkonzentrationen ($\text{PG}^{\text{X}}\text{HE}^2_{\text{Vial}}$) im 96-Well-Mikrotitermaßstab überprüft. Das dabei erzielte Wachstum findet sich in Abbildung 4.3.

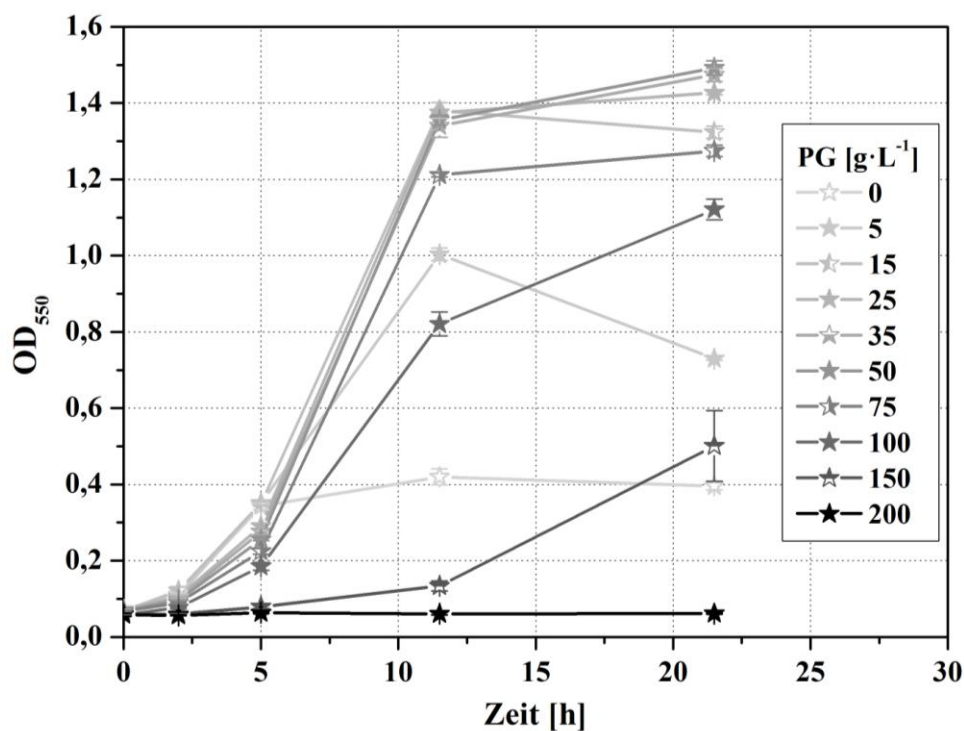


Abbildung 4.3: Entwicklung OD_{550} bei Kultivierung von AKR 17a auf $\text{PG}^{\text{X}}\text{HE}^2_{\text{Vial}}$ mit verschiedenen Pharmaglycerinstartkonzentrationen im 96-Well-Mikrotitermaßstab

Die Ergebnisse zeigen, dass AKR 17a in der Lage ist innerhalb von ca. 10 h auf Konzentrationen von bis zu $150 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Pharmaglycerin anzuwachsen. Dabei ist auf Grund seiner wachstumshemmenden Wirkung mit einer steigenden Glycerinstartkonzentration eine Verringerung der Wachstumsgeschwindigkeit zu beobachten. Die Wachstumsunterschiede im Vergleich zur Bestimmung der Hefeextraktstartkonzentration (siehe Kap. 4.2.1) haben einen experimentell bedingten Ursprung (Vorbereitungsdauer). Abfallende Werte für die optische Dichte weisen auf bereits einsetzende Zelllyse in Folge von Substratmangel hin. $25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Glycerin stellen einen sehr guten Kompromiss aus minimaler Wachstumshemmung bei gleichzeitiger Reduzierung des notwendigen Feedvolumens dar. Des Weiteren sind $25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ausreichend um selbst bei maximaler Produktivität (siehe Tabelle 4.1) zwischen zwei Messpunkten der Online-HPLC genügend Substrat zur Verfügung zu stellen. Zusätzlich ist eine höhere Vorlage von Glycerin nicht zielführend, da dieses ohne zusätzliche Pufferung im Vial- und 96-Well-Mikrotitermaßstab auf Grund der Säureproduktion nicht komplett umgesetzt werden kann. In Folge des sich einstellenden niedrigen pH-Wertes (≤ 5) kommt es dabei zu einer Wachstumsinhibierung.

4.2.3 Pharmaglycerinfermentation im 1 L-Maßstab

Die Fed-Batch Fermentation von AKR 17a wurde mit den überprüften Parametern ($\text{PG}^{25}\text{HE}^5$) erneut durchgeführt und lieferte die im Folgenden dargestellten Ergebnisse. Durch die Feedzugabe lag der auf das Endvolumen bezogene Hefeextrakteinsatz bei $11,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$.

Die in 35,5 h erzielten $87,6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 1,3-PD (siehe Abbildung 4.4) entsprechen einer Gesamtproduktivität von $2,5 \text{ g}_{1,3\text{-PD}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Die maximale Produktivität und die Ausbeuten konnten im Vergleich zur Fermentation im Rahmen der Stammauswahl (siehe Kap. 4.1) leicht auf $5,6 \text{ g}_{1,3\text{-PD}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ und $0,540 \text{ g}_{1,3\text{-PD}} \cdot \text{g}_{\text{Gly}}^{-1}$ bzw. $0,654 \text{ mol}_{1,3\text{-PD}} \cdot \text{mol}_{\text{Gly}}^{-1}$ gesteigert werden. Der Laugenverbrauch korreliert mit der Zunahme der 1,3-PD-Konzentration bzw. der damit einhergehenden Säureproduktion. Aus der Entwicklung der optischen Dichte ist ebenfalls erkennbar, dass die Bildung von 1,3-PD wachstumsassoziiert erfolgt. Die höchste bestimmte optische Dichte lag bei einem Wert von ca. 20 was einer Biotrockenmasse von ca. $5,7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ entspricht. An dieser Stelle soll noch einmal darauf hingewiesen werden, dass eine Abnahme der optischen Dichte nicht zwangsläufig mit einem Ende des mikrobiellen Wachstums gleichzusetzen ist. Es bedeutet lediglich, dass die Absterberate höher ist als das Zellwachstum.

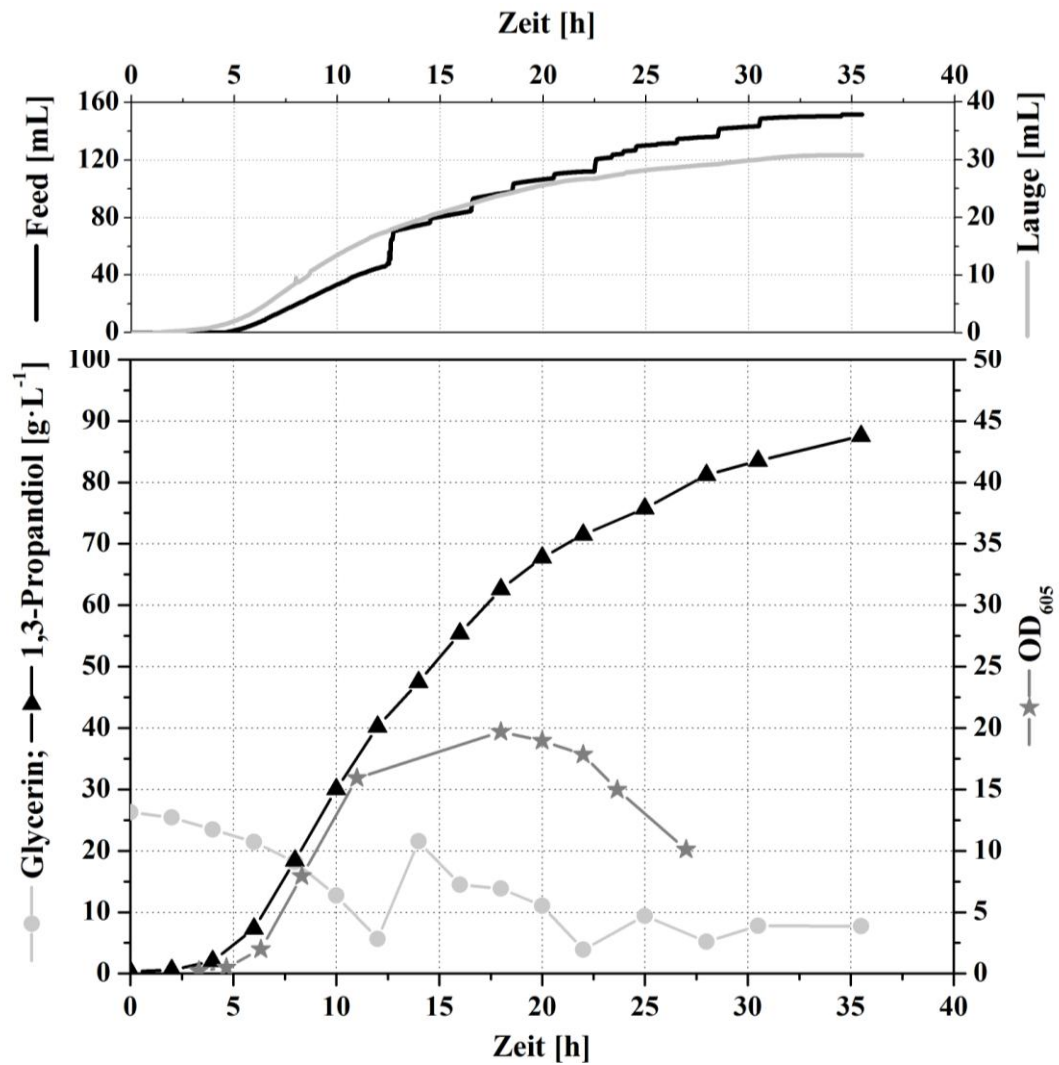


Abbildung 4.4: Fed-Batch Fermentation von AKR 17a mit Pharmaglycerin und Hefeextrakt ($\text{HE}_{\text{ges}} 11,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) im 1 L-Maßstab

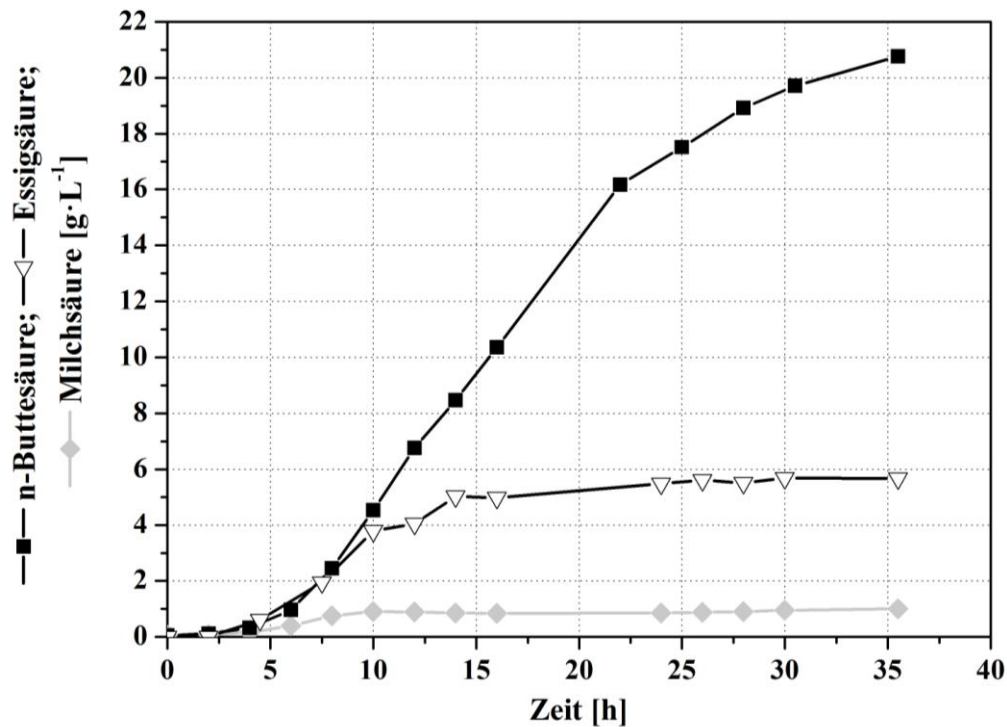


Abbildung 4.5 Nebenprodukte der Fed-Batch Fermentation von AKR 17a mit Pharmaglycerin und Hefeextrakt ($\text{HE}_{\text{ges}} 11,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) im 1 L-Maßstab

Der Verlauf der Nebenprodukte Butter-, Essig- und Milchsäure (siehe Abbildung 4.5) zeigt, dass deren Bildung parallel zur der von 1,3-PD einsetzt. Durch die Säurebildung werden ATP und Reduktionsäquivalente regeneriert, welche für die Biomassebildung benötigt werden (siehe Abbildung 2.6). Das Ende der Essigsäurebildung nach ca. 15 h fällt in den gleichen Zeitraum wie das Erreichen der höchsten optische Dichte. Es ist dabei nicht davon auszugehen, dass sich das Wachstum als alleinige Folge der Acetatkonzentration verlangsamt. Bei neutralem pH liegt für die maximal erreichte Essigsäurekonzentration von $5,7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ theoretisch noch keine wachstumsinhibierende Konzentration an undissoziierter Säure vor (siehe Kap. 2.6). Vermutlich wird zu diesem Zeitpunkt jedoch eine Gesamtmenge an inhibierenden Stoffwechselprodukten erreicht, die sich sichtbar auf das Wachstum auswirkt. Milchsäure wird nur zu Fermentationsbeginn gebildet und erreicht eine maximale Konzentration von $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Die kontinuierlich ansteigende Buttersäurekonzentration beträgt zum Fermentationsende $20,8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.

4.3 Scale-up in den 10 L-Maßstab (AKR 17a)

Um die Eignung als Produktionsstamm zu überprüfen, wurde die Fermentation unter Standardbedingung (PG²⁵HE⁵) in den 10 L-Maßstab übertragen (siehe Abbildung 4.6). In Folge der technischen Gegebenheiten (siehe Kap. 3.6.5) kam dabei weder eine Koppelung von Laugen- und Feeddosage, noch eine über Online-HPLC gesteuerte Fütterung zum Einsatz. Die Fütterungsraten wurden während der Fermentation entsprechend der Ergebnisse der Probenahmen manuell angepasst. Der Gesamtheefeextrakteinsatz belief sich auf ca. 11,5 g·L⁻¹.

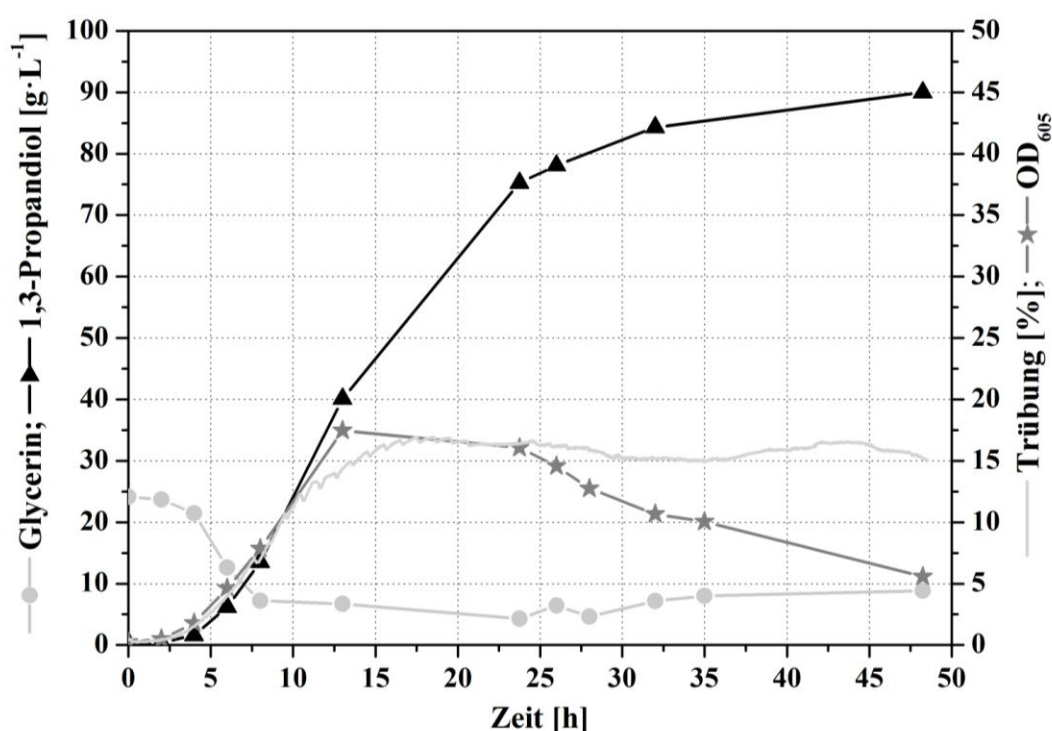


Abbildung 4.6: Scale-up der Fed-Batch Fermentation von AKR 17a mit Pharmaglycerin und Hefeextrakt (HE_{ges} 11,5 g·L⁻¹) in den 10 L-Maßstab

Die in 48 h erreichten 90 g·L⁻¹ 1,3-PD entsprechen einer Produktivität von 1,9 g_{1,3-PD}·L⁻¹·h⁻¹. Aus dem Konzentrationsverlauf lässt sich jedoch vermuten, dass die Endkonzentration bereits nach ca. 40 h erreicht wurde, was zu einer Gesamtproduktivität von ca. 2,3 g_{1,3-PD}·L⁻¹·h⁻¹ führt. Die Ausbeuten belaufen sich auf ca. 0,52 g_{1,3-PD}·g_{Gly}⁻¹ bzw. 0,63 mol_{1,3-PD}·mol_{Gly}⁻¹. Die Bildungszeitpunkte und Konzentrationen der Nebenprodukte entsprechen denen der Fermentation im 1 L-Maßstab. Sie betragen bei Fermentationsende für Essigsäure 5,6 g·L⁻¹, Buttersäure 22,1 g·L⁻¹ und Milchsäure 0,9 g·L⁻¹.

Im direkten Vergleich der Fermentationen im 1 bzw. 10 L-Maßstab (siehe Abbildung 4.7) ist erkennbar, dass ein Scale-up trotz Vereinfachungen der Prozessführung problemlos möglich ist. Die Verläufe beider Fermentationen sind nahezu identisch. Die positiven Eigenschaften, wie hohe 1,3-PD-Konzentration und Produktivität, konnten somit im Großmaßstab reproduziert werden. Dies spricht für eine sehr hohe Prozessstabilität und Robustheit des Stammes AKR 17a.

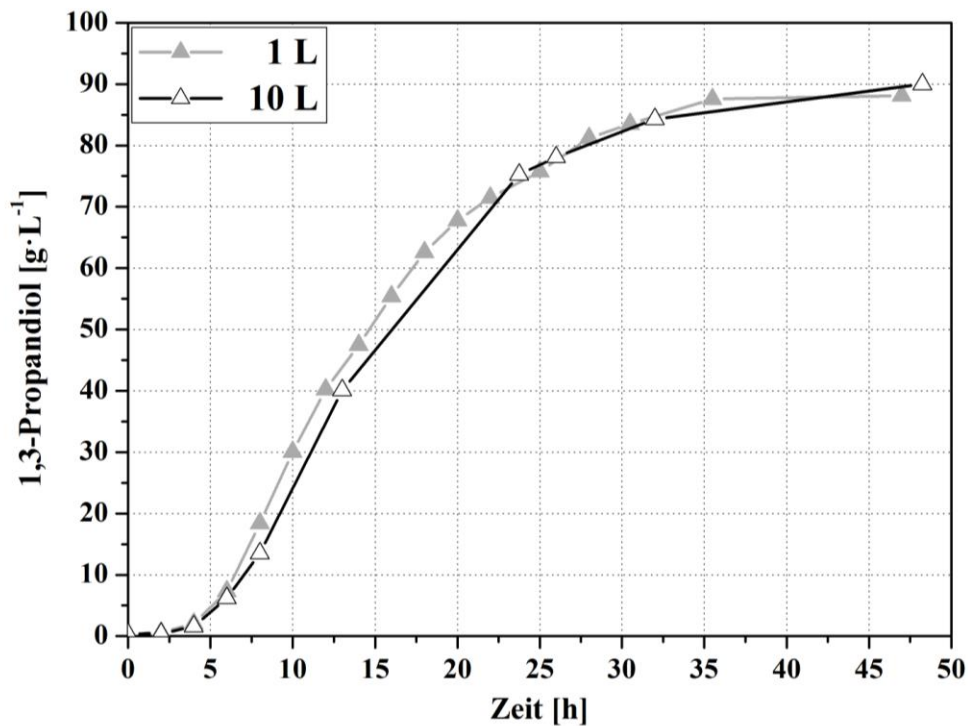


Abbildung 4.7: Vergleich der Pharmaglycerin-Fermentationen mit AKR 17a im 1 bzw. 10 L-Maßstab

4.4 Einfluss von Rohglycerin (AKR 17a)

4.4.1 Vergleich verschiedener Rohglycerinqualitäten

Um die Eignung verschiedener Rohglycerinqualitäten zu testen, wurden diese für Fed-Batch Fermentationen ($\text{RG}_\text{x}^{25}\text{HE}^5$, 1 L-Maßstab) eingesetzt. Alle 4 Glycerine stammten von dem Standort Schwarzheide der Biopetrol GmbH und wurden an verschiedenen Punkten der Glycerinaufbereitung (siehe Kap. 3.2.5 und Abbildung 6.1) entnommen. Durch den sinkenden Grad der Verunreinigungen (z. B. Fettsäuren, Salz, Matter Organic Non Glycerol) steigt dabei sowohl die Qualität als auch der zu erwartende Preis von K501 über technisches und gebliches Glycerin bis hin zu Pharmaglycerin an. Zu jedem Prozessschritt besitzen die Rohglycerine dabei unterschiedliche Glycerinkonzentrationen. Um eine Beeinträchtigung der

Ergebnisse durch die verschiedenen Konzentrationen auszuschließen, wurde für diesen Vergleich der Glycingehalt aller Feed-Lösungen einheitlich auf etwa 40 % (w/v) verdünnt. Gleichzeitig wurde die Hefeextraktkonzentration im Feed auf $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ halbiert um den Gesamtmaterialeinsatz im Vergleich zur Referenz (siehe Kap. 4.2.3) konstant zu halten. In Abbildung 4.8 finden sich die Verläufe der 1,3-PD-Konzentrationen und in Tabelle 4.2 die erreichten Ausbeuten und Produktivitäten.

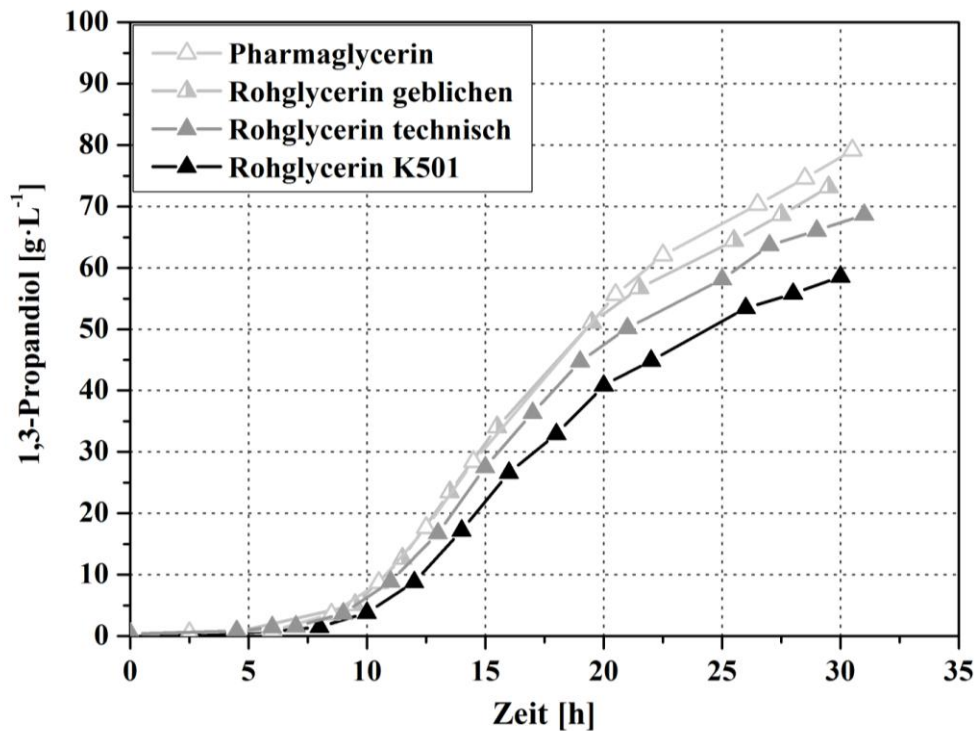


Abbildung 4.8: 1,3-PD-Konzentrationen für Fed-Batch Fermentationen von AKR 17a mit verschiedenen Rohglycerinqualitäten

Tabelle 4.2: Konzentrationen* von 1,3-PD und Glycerin sowie Produktivitäten* und Ausbeuten* für Fed-Batch Fermentationen von AKR 17a mit verschiedenen Rohglycerinqualitäten

	Pharma	geblichen	technisch	K501
Zeit [h]	30,5	29,5	31,0	30,0
1,3-PD _{end} [g·L ⁻¹]	79,2	73,1	68,7	58,6
Glycerin _{end} [g·L ⁻¹]	9,2	11,6	15,7	19,2
Q _{ges} [g _{1,3-PD} ·L ⁻¹ ·h ⁻¹]	2,6	2,5	2,2	2,0
Q _{max} [g _{1,3-PD} ·L ⁻¹ ·h ⁻¹]	5,4	5,4	5,4	4,7
Y [g _{1,3-PD} /g _{Gly}]	0,557	0,553	0,524	0,496
Y [mol _{1,3-PD} /mol _{Gly}]	0,674	0,669	0,634	0,600

*Werte beziehen sich auf das Ende des Beobachtungszeitraumes

Die erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass mit steigender Aufarbeitungsstufe des Rohglycerins eine Steigerung sowohl der Gesamt- und Maximalproduktivität, als auch der Ausbeute erreicht werden kann. Da der Preis für Rohglycerin der niedrigsten erhältlichen Aufarbeitungsstufe (K501) nur bei ca. 1/5 des Preises von Pharmaglycerin (persönliche Kommunikation mit Biopetrol) lag, wurde angestrebt, dieses für die biotechnologische 1,3-PD-Produktion zu nutzen. Orientiert man sich an den ökonomischen Auswirkungen der im Kostendiagramm dargestellten Faktoren (Sensitivitätsanalyse Abbildung 2.4), so ist davon auszugehen, dass der erheblich niedrigere Rohglycerinpreis die resultierende Kostensteigerungen durch erforderliche Aufarbeitung (geringere Produktkonzentration) und geringere Ausbeute (Materialeinsatz) deutlich kompensiert. Dies gilt besonders, wenn es durch weitere Optimierung gelingt die Konzentration an 1,3-PD zu erhöhen.

4.4.2 Scale-up der Rohglycerinfermentation in den 10 L-Maßstab

Für das Scale-up der Fermentation mit Rohglycerin K501 (siehe Kap. 4.4.1) in den 10 L-Maßstab wurde das Animpfvolumen von ca. 3 auf 6 % (v/v) erhöht um die lag-Phase zu verkürzen. Da die sich auf dem Rohglycerin absetzende ölige Schwimmschicht wachstumsinhibierende Fettsäuren und Schwermetalle enthalten kann (siehe Kap. 2.5.4), wurden die Feedlösungen bei einem zu niedrigen Füllstand der Behälter ausgetauscht. Dies verhinderte die Einbringung der Schwimmschicht in den Fermenter im Rahmen der Feeddosage.

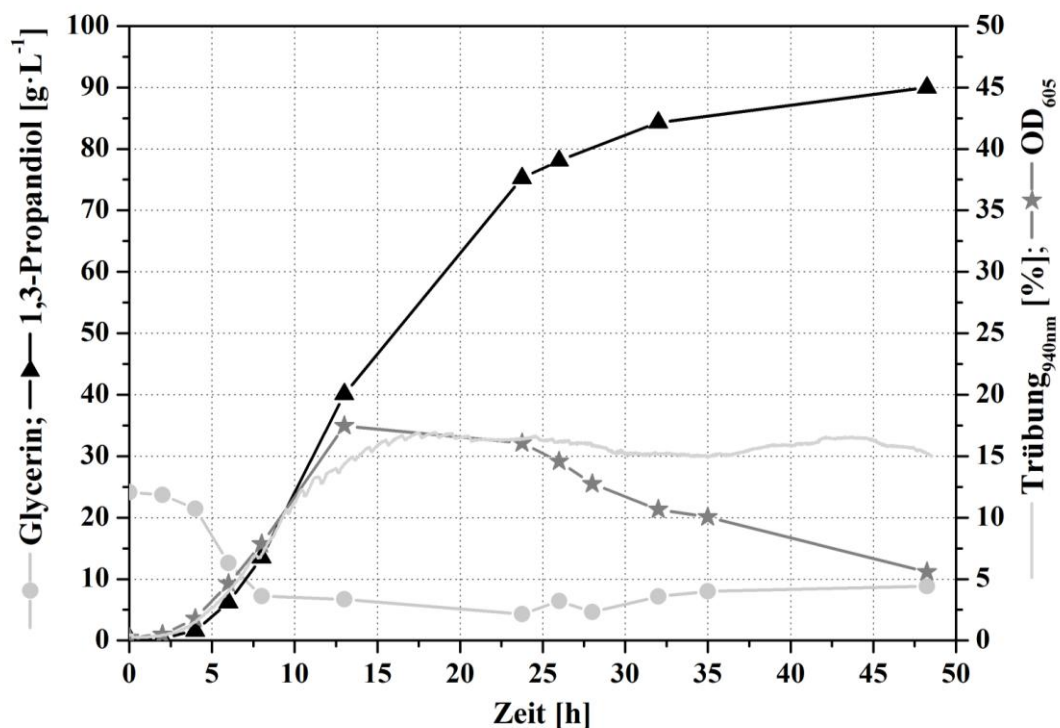


Abbildung 4.9: Scale-up der Fed-Batch Fermentation von AKR 17a mit Rohglycerin K501 und Hefeextrakt ($\text{HE}_{\text{ges}} 9,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) in den 10 L-Maßstab

Nach 48,5 h wird eine Konzentration von $77,3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 1,3-PD erreicht (siehe Abbildung 4.9). Für die Gesamtproduktivität ergibt sich demnach ein Wert von $1,6 \text{ g}_{1,3\text{-PD}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ bei einer maximalen Produktivität von ca. $5 \text{ g}_{1,3\text{-PD}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Bei einem deutlich früheren Fermentationsabbruch nach 32 h könnte bei einer nur etwas geringeren 1,3-PD-Konzentration von $73,3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ eine Produktivität von $2,3 \text{ g}_{1,3\text{-PD}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ erzielt werden. Die auf den gesamten Prozess bestimmte Ausbeute liegt bei $0,49 \text{ g}_{1,3\text{-PD}} \cdot \text{g}_{\text{Gly}}^{-1}$ bzw. $0,60 \text{ mol}_{1,3\text{-PD}} \cdot \text{mol}_{\text{Gly}}^{-1}$ und damit auf dem Niveau des Versuches im 1 L-Maßstab (siehe Tabelle 4.2). Die Endkonzentrationen von Milch-, Essig- und Buttersäure belaufen sich auf 0,8; 5,2 bzw. $19,2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$.

Die 1,3-PD-Konzentration konnte im Vergleich zum 1 L-Maßstab deutlich gesteigert werden, liegt jedoch weiterhin unter denen der Referenzfermentationen mit Pharmaglycerin (siehe Abbildung 4.7). Der auf das Endvolumen bezogene Hefeextraktgesamteinsatz lag durch die halbierte HE-Konzentration im Rohglycerin-Feed nur bei ca. $9,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ im Vergleich zu den zuvor genutzten ca. $11,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. Weiterhin wurden in Folge des geringen Glyceringehaltes der Rohglycerin-Feedlösung ca. 50 % des vorgelegten Medienvolumens benötigt, um dem Fermenter die notwendige Substratmenge zuzuführen. Im Gegensatz dazu lag dieser Wert für die PG-Referenzfermentationen nur bei etwa 25 %. Hierdurch ergab sich für die Rohglycerin-fermentation ein deutlicher Verdünnungseffekt. Eine Konzentrationserhöhung der Medienbestandteile (exklusive Hefeextrakt), entweder durch erhöhte Vorlage oder Nachführung über die Feedlösung, hatte jedoch in weiterführenden Versuchen keine Steigerung der 1,3-PD-Konzentration zur Folge. Es fällt weiterhin auf, dass der Glyceringehalt jeweils nach ca. 8 h und gegen Fermentationsende auf annähernd Null sank. Zur Überprüfung ob die kurze Hungerphase bzw. der komplette Verbrauch des Substrates ein besseres Ergebnis verhindert hat, wurden Wiederholungen der Fermentation durchgeführt. Trotz bis zum Fermentationsende konstant höherer Glyceringehalte konnte ebenfalls keine Beschleunigung der Produktion bzw. Erhöhung der 1,3-PD-Konzentration erreicht werden. Es ist daher anzunehmen, dass die Begrenzung der maximal erreichten 1,3-PD-Konzentration auf der Anhäufung wachstumsinhibierender Verunreinigungen des Rohglycerins (Fettsäuren, Salze, usw.) beruht.

Durch die erfolgreiche Nutzung von Rohglycerin niederer Qualität können die Medienkosten eines möglichen industriellen Biokonversionsprozesses deutlich gesenkt werden. Die dabei mit AKR 17a erreichte 1,3-PD-Konzentration gehört zu den höchsten bisher für die Nutzung von Rohglycerin publizierten Ergebnissen (siehe Tabelle 2.2).

4.5 Zusammenfassung der Ergebnisse mit AKR 17a

Im Rahmen der Stammauswahl wurde AKR 17a auf Grund der höchsten 1,3-PD-Konzentration, guten Ausbeute und sehr guten Rohglycerintoleranz für weiterführende Versuche ausgewählt. Durch ein Scale-up in den 10 L-Maßstab, welches geringe Änderungen der Prozessführung erforderte, konnte eine hohe Robustheit des Stammes und eine stabile 1,3-Produktion nachgewiesen werden. Des Weiteren war es möglich auch mit dem Einsatz von Rohglycerin der niedrigsten Aufarbeitungsstufe hohe Konzentrationen an 1,3-PD bei gleichzeitig hoher Produktivität zu erzielen. Sowohl die mit Pharma- als auch Rohglycerin erzielten 1,3-PD-Konzentrationen gehören zu den höchsten für natürliche Produzenten publizierten Werten.

4.6 Stammauswahl nach optimiertem Screening (Screening 2)

Da das Screening nach natürlichen gram-positiven 1,3-PD-Produzenten im Rahmen des Projektes weitergeführt und optimiert wurde, erfolgte eine Evaluierung neuer vielversprechender Stämme. Die neu-gescreenten Stämme AKR 91b, AKR 92a und AKR 102a wurden unter Standardbedingungen ($\text{PG}^{25}\text{HE}^5$, pH 7, 32 °C) im 1 L-Maßstab fermentiert und mit dem bis zu diesem Zeitpunkt eingesetzten Stamm AKR17a verglichen. Diese 1,3-PD-Produzenten entstammen Bodenproben einer Palmölraffinerie und zeichneten sich bereits im Rahmen der Vorauswahl sowohl durch eine hohe 1,3-PD- und Glycerintoleranz als auch einen geringen Bedarf an Supplinen (Hefeextrakt) aus [Ringel et al. 2012]. Analog zum ersten Auswahlverfahren (siehe Kap. 4.1) dienten die maximale Produktkonzentration, Produktivität und Ausbeute als Vergleichskriterien. Berechnungsgrundlage war jeweils der Zeitpunkt ab welchem keine signifikante Steigerung der 1,3-PD-Konzentration mehr erreicht werden konnte. Die Ergebnisse finden sich in Abbildung 4.10 und Tabelle 4.4. Als Vergleich für die neu-gescreenten Stämme kam hierbei der bekannte anaerobe 1,3-PD-Produzent *Clostridium diolis* DSM 151410 (ehemals *Clostridium butyricum* DSM 5431) zum Einsatz. Zusätzlich zu den Fermentationsergebnissen diente die Fähigkeit ohne Hefeextrakt wachsen zu können als zusätzliches Auswahlkriterium. Hierfür wurde im 50 mL-Vialmaßstab der Hefeextrakt des $\text{PG}^{25}\text{HE}^1_{\text{Vial}}$ durch $1 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ einer Vitaminlösung (siehe Kap. 3.2.3) ersetzt und die Stämme auf Wachstum überprüft (siehe Tabelle 4.3).

Tabelle 4.3: Fähigkeit der neu-gescreenten Stämme zum Wachstum mit Vitaminlösung anstatt Hefeextrakt

	AKR 17a	AKR 91b	AKR 92a	AKR 102a
Wachstum ohne Hefeextrakt	ja	ja	nein	ja

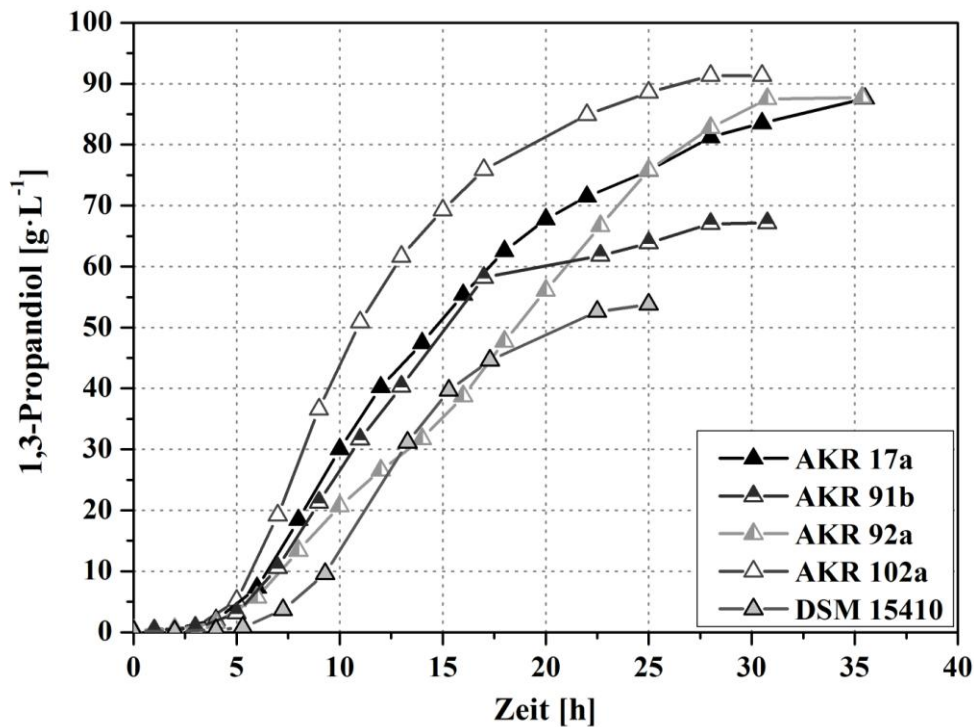


Abbildung 4.10: 1,3-PD-Konzentrationen für 1 L-Fed-Batch Fermentationen der neu-gescreenten Stämme AKR 91b, 92a, 102a im Vergleich zu AKR 17a und DSM 15410

Tabelle 4.4: Endkonzentrationen von 1,3-PD und Pharmaglycerin sowie Produktivitäten und Ausbeuten für Fed-Batch Fermentationen der neu-gescreenten Stämme und DSM 15410

	AKR 17a	AKR 91b	AKR 92a	AKR 102a	DSM 15410
Zeit [h]	35,5	28,0	31,0	28,0	25
1,3-PD _{end} [g·L ⁻¹]	87,6	67,0	87,5	91,3	53,8
Glycerin _{end} [g·L ⁻¹]	7,7	21,7	11,0	4,7	22,3
Q _{ges} [g _{1,3-PD} ·L ⁻¹ ·h ⁻¹]	2,5	2,4	2,8	3,3	2,2
Q _{max} [g _{1,3-PD} ·L ⁻¹ ·h ⁻¹]	5,8	5,4	4,5	7,9	5,4
Y [g _{1,3-PD} ·g _{Gly} ⁻¹]	0,540	0,437	0,561	0,530	0,526
Y[mol _{1,3-PD} ·mol _{Gly} ⁻¹]	0,654	0,528	0,678	0,640	0,637

Der bisher verwendete Stamm AKR 17a erreichte unter optimalen Bedingungen $87,6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 1,3-PD bei einer molaren Ausbeute von 0,65. Zusätzlich ist er zum Wachstum ohne Hefeextrakt befähigt und hatte seine Fähigkeit zur Rohglycerinverwertung bereits unter Beweis gestellt (siehe Kap. 4.4.2). AKR 91b zeichnet sich durch die Fähigkeit aus mit sehr wenig bzw. ohne Hefeextrakt wachsen zu können. Des Weiteren wies er im Rahmen der Vor-evaluation die größte Rohglycerintoleranz auf [Ringel 2012]. Jedoch stellen sowohl die Konzentration von $67 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 1,3-PD als auch die molare Ausbeute von 0,53 die niedrigsten Werte der getesteten neu-gescreenten Stämme dar. Mit dem Stamm AKR 92a konnte eine 1,3-Propandiolkonzentration von $87,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ bei einer Ausbeute von $0,561 \text{ g}_{1,3\text{-PD}} \cdot \text{g}_{\text{Gly}}^{-1}$ bzw. $0,678 \text{ mol}_{1,3\text{-PD}} \cdot \text{mol}_{\text{Gly}}^{-1}$ erreicht werden. Die in diesem Vergleich höchste Ausbeute steht jedoch im Gegensatz zu der fehlenden Fähigkeit auf Medium ohne Hefeextrakt wachsen zu können und der fehlenden Toleranz gegenüber hohen Rohglycerinkonzentrationen. Der Stamm AKR 102a wies unter Standardbedingungen eine sehr kurze lag-Phase und die höchste erzielte 1,3-PD-Konzentration von $91,3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ bei einer molaren Ausbeute von 0,64 auf. Die erreichte Produktivität lag bei $3,3 \text{ g}_{1,3\text{-PD}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ und damit mehr als 30 % über der des bisher verwendeten Stammes AKR 17a. Gleiches gilt für die maximale Produktivität von $7,9 \text{ g}_{1,3\text{-PD}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Die sehr guten Ergebnisse der Fermentation zusammen mit der hohen Glycerin- bzw. Rohglycerintoleranz und der Fähigkeit ohne Hefeextrakt wachsen zu können, machen AKR 102a zum Vielversprechendsten aller getesteten Stämme. Daher wird AKR 102a als potenzieller Produktionsstamm für weiterführende Versuche eingesetzt.

4.7 Optimierung der Kultivierungsbedingungen (AKR 102a)

Für den Stamm AKR 102a wurden sowohl die Parameter Hefeextrakt- und Glycerinstartkonzentration, als auch die Fermentationstemperatur auf ihr Optimierungspotenzial hin überprüft.

4.7.1 Startkonzentration von Hefeextrakt

Die Bestimmung der geeigneten Hefeextraktstartkonzentration erfolgte auf $\text{PG}^{25}\text{HE}_{\text{Vial}}^{\text{X}}$ im 96-Well-Mikrotitermaßstab. Der Wachstumsverlauf in Form der optischen Dichte findet sich in Abbildung 4.11. Da die Auswirkung verschiedener Hefeextraktkonzentrationen auf den

Fermentationsbeginn ermittelt werden sollte, lag der Schwerpunkt der Betrachtung auf den ersten 5 Stunden der Kultivierung.

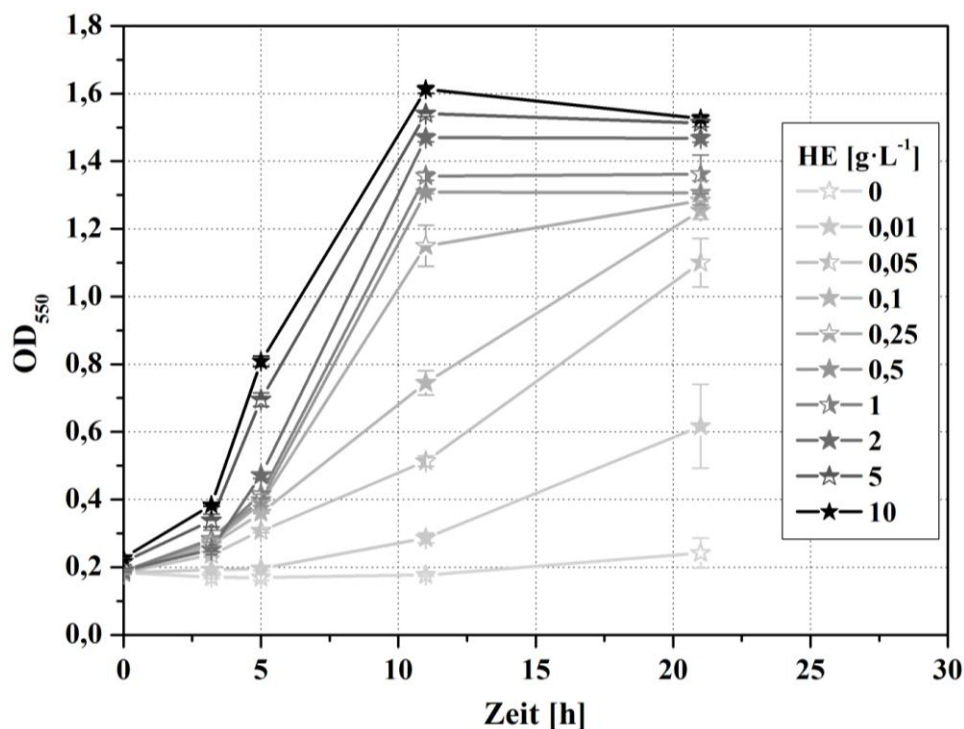


Abbildung 4.11: Verlauf OD_{550} bei Kultivierung von AKR 102a auf $PG^{25}HE^X_{Vial}$ mit verschiedenen Hefeextraktkonzentrationen im 96-Well-Mikrotitermaßstab

Es zeigt sich, dass ein steigender Gehalt an Hefeextrakt zur einer Erhöhung des Wachstums führt. Bereits ab $0,01 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ kann ein im Beobachtungszeitraum sichtbares Zellwachstum festgestellt werden. Analog zu AKR 17a (siehe Kap. 4.2.1) wird erneut deutlich, dass eine Erhöhung der Hefeextraktkonzentration von $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ auf $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ während der ersten 5 Stunden unter den gewählten Testbedingungen keine erhebliche Beschleunigung des Wachstums bewirkt. In Folge dessen verbleibt die Hefeextraktkonzentration für Fed-Batch Fermentationen bei $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. Ebenso werden $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ für 96-Well und $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ für Vialversuche beibehalten.

4.7.2 Startkonzentration von Glycerin

Mit $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Hefeextrakt wurde das Wachstum von AKR 102a mit verschiedenen Pharmaglycerinkonzentrationen ($PG^XHE^2_{Vial}$) im 96-Well-Mikrotitermaßstab überprüft. Das dabei erzielte Wachstum findet sich in Abbildung 4.12.

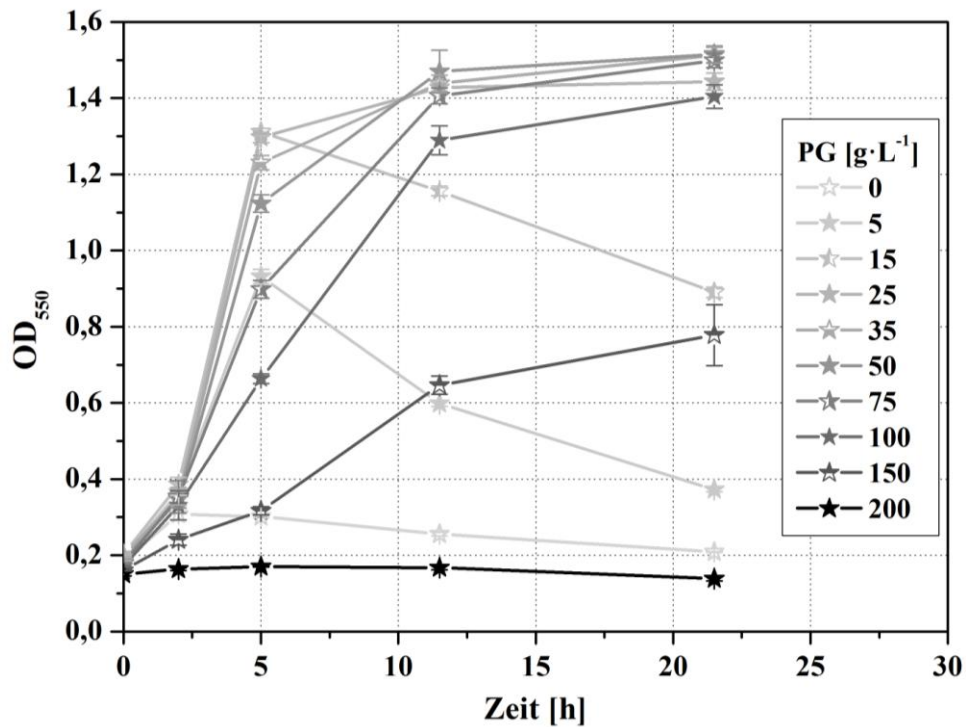


Abbildung 4.12: Verlauf OD₅₅₀ bei Kultivierung von AKR 102a auf PG^xHE²_{vial} mit verschiedenen Pharmaglycerinkonzentrationen im 96-Well-Mikrotitermaßstab

Anhand der Ergebnisse wird deutlich, dass AKR 102a die Fähigkeit besitzt auf Konzentrationen von bis zu 150 g·L⁻¹ Pharmaglycerin ohne längere lag-Phase anzuwachsen. Tendenziell geht dabei auf Grund seiner wachstumshemmenden Wirkung mit einer höheren Glycerinkonzentration eine Verringerung der Wachstumsgeschwindigkeit einher. Für 200 g·L⁻¹ Glycerin kann im Versuchszeitraum kein Wachstum beobachtet werden. Die Wachstumsunterschiede im Vergleich zum vorherigen Versuch (siehe Kap. 4.7.1) haben ihren Ursprung in experimentell bedingten Zeitabläufen während der Versuchsvorbereitung. Abfallende Werte für die optische Dichte der Ansätze mit 5 bzw. 15 g·L⁻¹ PG weisen auf bereits einsetzende Zelllyse in Folge von Substratmangel hin. Nach 5 Stunden wird mit 25 g·L⁻¹ Glycerin die höchste optische Dichte erreicht. Da unter Fed-Batch Bedingungen nach ca. 4 - 6 h die Zufütterung von Glycerin ausgelöst wird, verbleibt die Startkonzentration daher für AKR 102a bei 25 g L⁻¹.

4.7.3 Temperatur

Die Temperatur hat große Auswirkungen auf den Verlauf der Kultivierung. Eine Erhöhung kann z. B. im Rahmen der Reaktionsgeschwindigkeit-Temperatur-Regel (van't Hoff'sche Regel) eine Beschleunigung der Zellprozesse ermöglichen aber gleichzeitig eine potenziell nachteilige Veränderung der Membranzusammensetzung [Khuller et al. 1974] bewirken.

4.7.3.1 Einfluss der Temperatur ohne Vorlage von 1,3-Propandiol

Der Temperatureinfluss wurde mit PG²⁵HE¹_{vial} im 50 mL-Vialmaßstab getestet. Der Verlauf des Zellwachstums ist in der folgenden Abbildung 4.13 dargestellt.

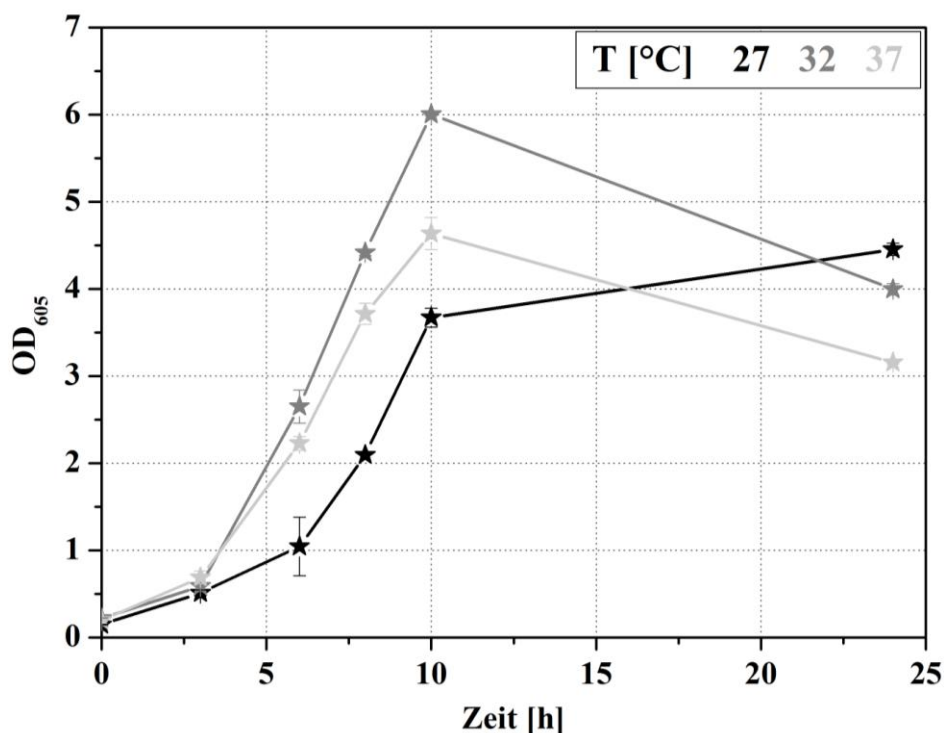


Abbildung 4.13: Verlauf OD₆₀₅ bei Kultivierung von AKR 102a mit PG²⁵HE¹_{vial} bei verschiedenen Temperaturen im 50 mL-Vial

Ein Absenken der Kultivierungstemperatur von 32 °C auf 27 °C führte zu einer Verlangsamung des Zellwachstums während der ersten 6 h. Ebenso resultierte aus einer Erhöhung der Temperatur auf 37 °C ein im Vergleich zu 32 °C geringeres Wachstum. Aus der Wachstumskopplung ergibt sich demnach in beiden Fällen auch eine verringerte 1,3-PD-Bildungsgeschwindigkeit (siehe Abbildung 4.14). Der Versuch zeigt, dass 32 °C in Bezug auf den Fermentationsbeginn die geeignetste Temperatur darstellt.

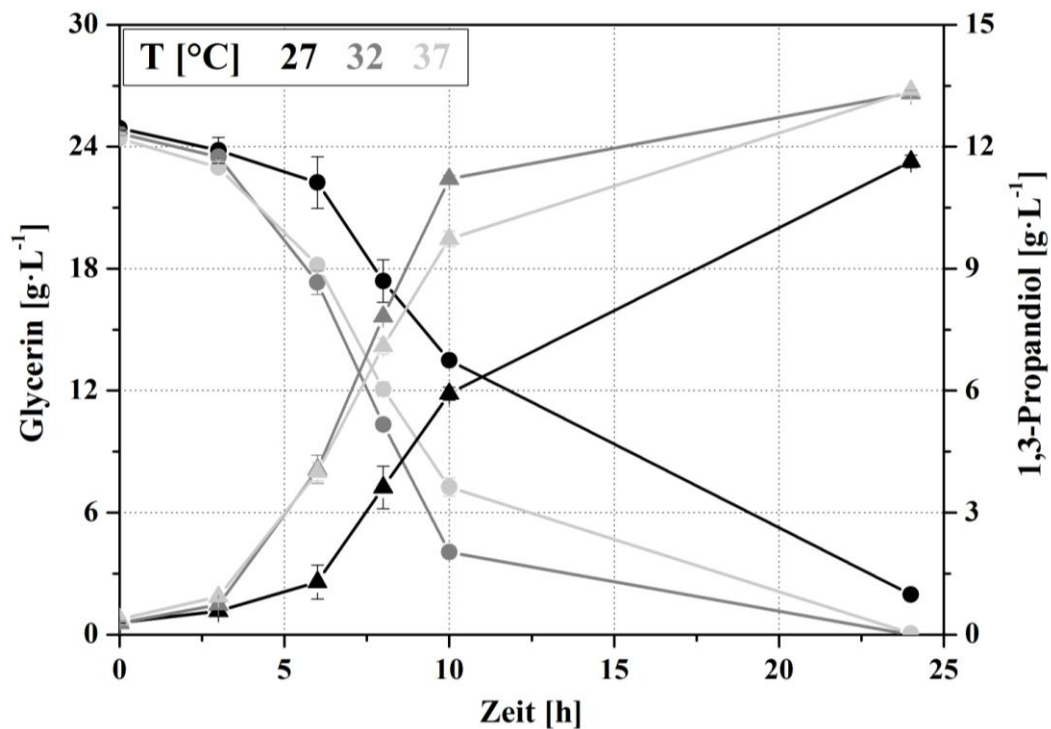


Abbildung 4.14: Glycerin- (Kreis) und 1,3-PD-Konzentration (Dreieck) bei Kultivierung von AKR 102a mit PG²⁵HE¹_{Vial} bei verschiedenen Temperaturen im 50 mL-Vial

4.7.3.2 Einfluss der Temperatur mit Vorlage von 1,3-Propandiol

Um zu überprüfen, welchen Einfluss eine Variation der Temperatur zu einem fortgeschrittenem Stadium einer Fermentation besitzt, erfolgte die Wiederholung des Versuches bei gleichzeitiger Vorlage von ca. 50 g·L⁻¹ 1,3-PD.

Generell zeigt sich, dass die Vorlage von 1,3-Propandiol zu einer Verlangsamung des Wachstums führt. Bei 32 °C steigt die benötigte Zeit für den maximalen Glycerinverbrauch von unter 25 h auf über 40 h. Jedoch werden bei dieser Temperatur erneut die höchsten Wachstums- und damit auch 1,3-PD-Bildungsraten erreicht (siehe Abbildung 4.15 und Abbildung 4.16). Im Gegensatz zum vorherigen Versuch führt unter den gewählten Bedingungen eine Absenkung der Temperatur auf 27 °C zu einem besseren Ergebnis als die Erhöhung auf 37 °C. Die Auswirkungen des vorgelegten 1,3-Propandiols im Zusammenhang mit der gesteigerten Temperatur werden besonders bei der Betrachtung der Zellmorphologie deutlich. Nach 2 Tagen Inkubation haben sich lange Ketten gebildet welche für eine starke Beeinträchtigung der Zellprozesse sprechen (siehe Abbildung 4.17).

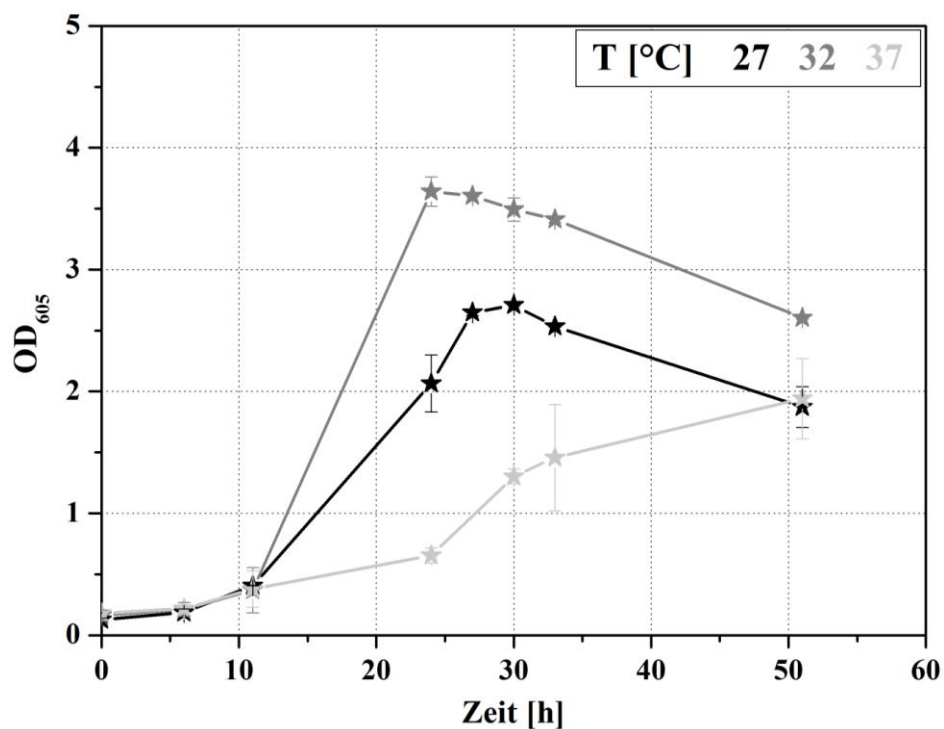


Abbildung 4.15: Verlauf OD_{605} bei Kultivierung von AKR 102a auf $PG^{25}HE^1_{Vial}$ und Vorlage von $50\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 1,3-PD bei verschiedenen Temperaturen im 50 mL-Vial

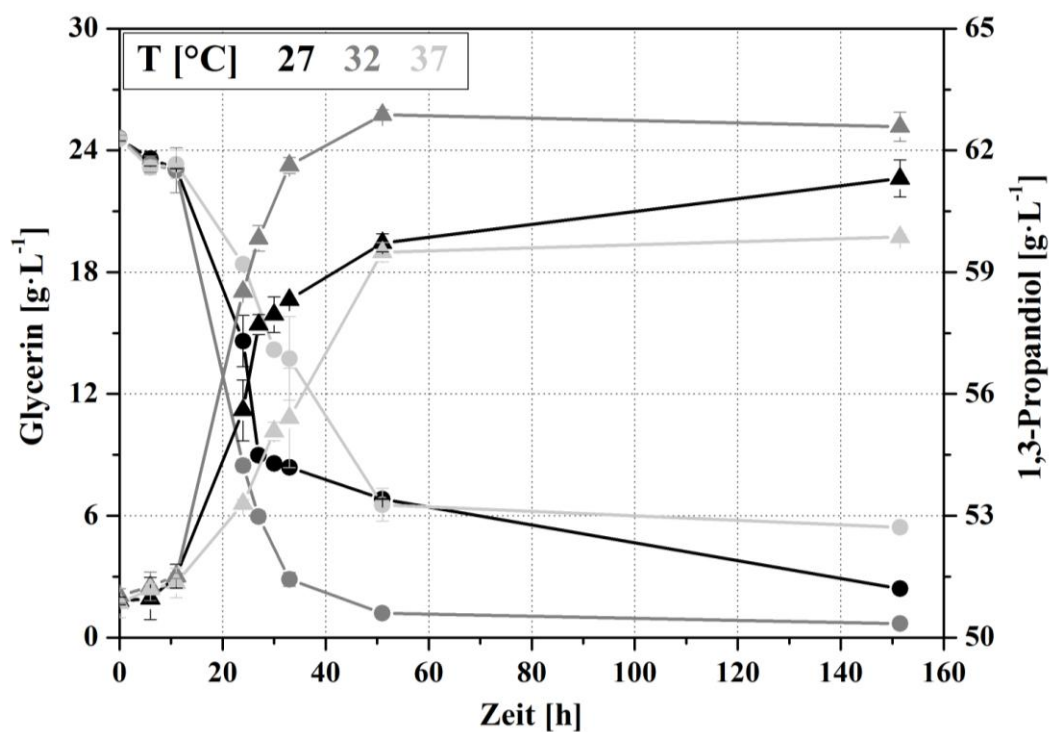


Abbildung 4.16: Glycerin- (Kreis) und 1,3-PD-Konzentration (Dreieck) bei Kultivierung von AKR 102a mit $PG^{25}HE^1_{Vial}$ und Vorlage von $50\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 1,3-PD bei verschiedenen Temperaturen im 50 mL-Vial

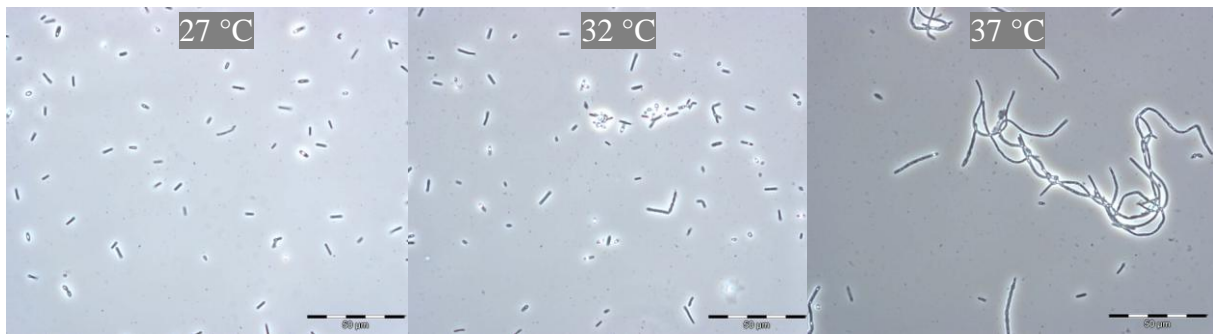


Abbildung 4.17: Mikroskopaufnahme (40 fache Vergrößerung) nach 51 h Kultivierung von AKR 102a mit $\text{PG}^{25}\text{HE}^1_{\text{vial}}$ und Vorlage von $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 1,3-PD bei verschiedenen Temperaturen

Für *Clostridium butyricum* wird über eine Veränderung der Membranzusammensetzung (z.B. Phospholipide und Fettsäuren) als Reaktion auf eine Temperaturerhöhung berichtet [Khuller et al. 1974]. Dies könnte der Grund für die Verstärkung der inhibierenden Wirkung von 1,3-PD sein, da diese auf der Beeinflussung der Membranfluidität bzw. Inhibierung membranständiger ATPasen und Transportmechanismen beruhen könnte (siehe Kap. 2.6).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass 32 °C im getesteten Temperaturbereich die optimale Fermentationstemperatur darstellt. Eine Prozessführung bei 32 °C ermöglicht die beste Kombination aus schnellem Wachstum und möglichst geringer Beeinträchtigung bei hohen 1,3-PD-Konzentrationen.

4.7.4 Pharmaglycerinfermentation im 1 L-Maßstab

Die Fed-Batch Fermentation wurde mit den überprüften Kultivierungsparametern ($\text{PG}^{25}\text{HE}^5$, pH 7, 32 °C) erneut durchgeführt (siehe Abbildung 4.18). In Folge sinkender Glycerinkonzentrationen erfolgte die Aktivierung der HPLC-gesteuerten Fütterung nach 5 Stunden. Durch die Feedzugabe lag der auf das Endvolumen bezogene Hefeextrakteinsatz bei ca. $11 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. Die maximale Produktivität von $8,1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ wurde zwischen 5 und 12 Stunden nach Fermentationsbeginn erreicht. Im weiteren Verlauf konnte ab ca. $70 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 1,3-PD ein merklicher Abfall der Produktivität beobachtet werden. Nach 28 Stunden lag die maximale 1,3-PD-Konzentration bei $93,7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ bei einem verbleibenden Glyceringehalt von $6,4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. Hierdurch ergeben sich eine sehr hohe Gesamtproduktivität von $3,3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ und Ausbeuten von $0,522 \text{ g}_{1,3\text{-PD}} \cdot \text{g}_{\text{Gly}}^{-1}$ bzw. $0,632 \text{ mol}_{1,3\text{-PD}} \cdot \text{mol}_{\text{Gly}}^{-1}$. Auch für AKR 102a wird besonders zu Fermentationsbeginn (bis 10 h) durch den parallelen Anstieg von optischer Dichte (Biomasse) und 1,3-PD-Konzentration die Wachstumsassoziation der 1,3-PD-Bildung erkennbar. Die

maximale bestimmte optische Dichte von 27,3 entspricht einer Biotrockenmasse von ca. $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$.

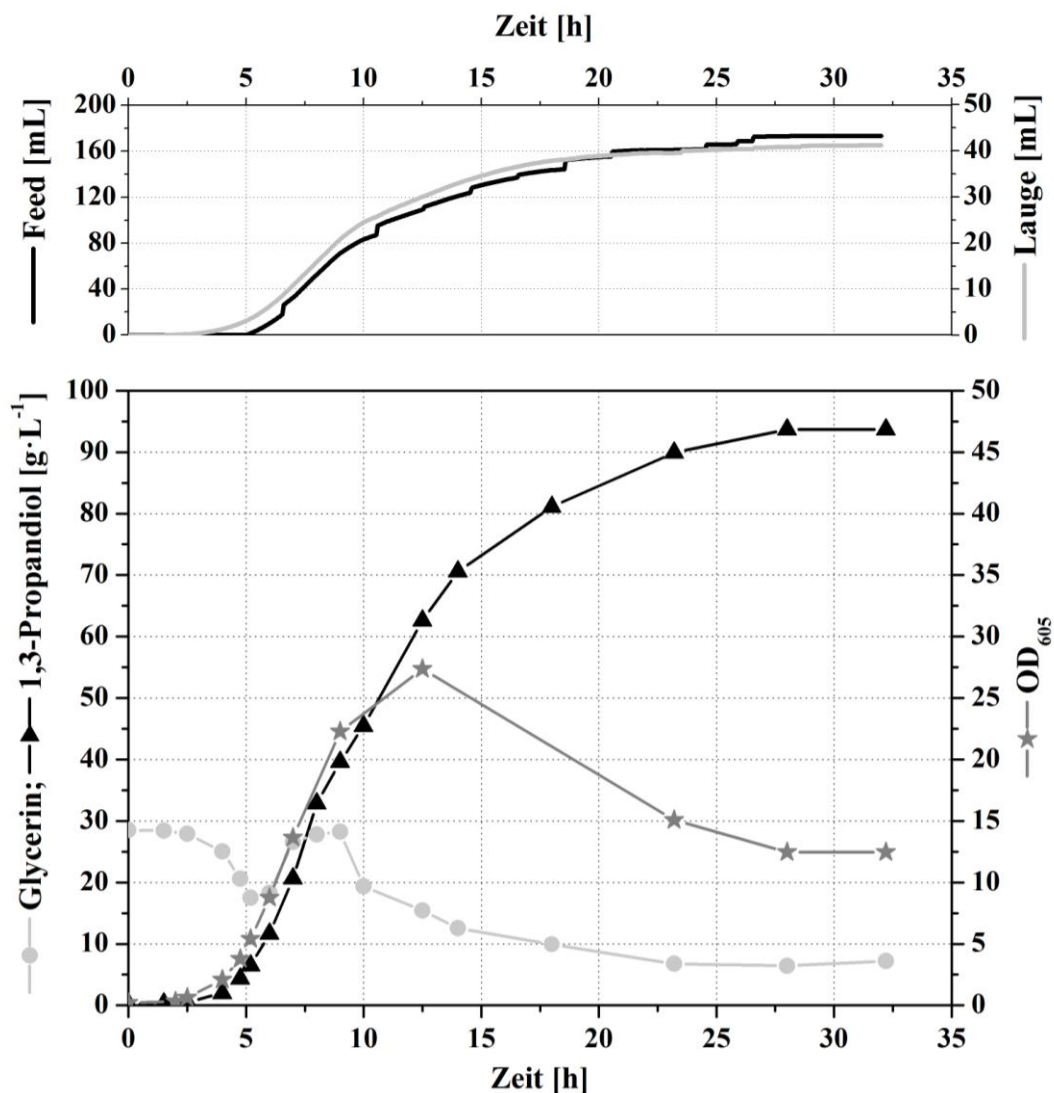


Abbildung 4.18: Fed-Batch Fermentation von AKR 102a mit Pharmaglycerin und Hefeextrakt ($\text{HE}_{\text{ges}} 11 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) im 1 L-Maßstab

Im Rahmen der Produktion organischer Säuren (siehe Abbildung 4.19) ist zu beobachten, dass die Essigsäurebildung ca. 2 Stunden vor der Milchsäure- bzw. Buttersäurebildung einsetzt. Ab ca. $\frac{1}{3}$ der Prozessdauer ist bis zum Fermentationsende keine signifikante Konzentrationsänderung für Essig- ($7,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) bzw. Milchsäure ($1,0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) mehr zu beobachten. Die Buttersäurekonzentration steigt jedoch bis zum Fermentationsende kontinuierlich bis auf $20,3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ an. Dies hat seine Ursache in der für fortlaufendes Zellwachstum notwendigen Gewinnung von ATP und Reduktionsäquivalenten durch die Bildung von Buttersäure (siehe Abbildung 2.6). Jedoch wirkt sich die Verschiebung der Säureproduktion hin zur Buttersäure auf die 1,3-PD-Ausbeuten aus. Im Verlauf der Fermentation kommt es dabei zu einer

Verringerung der erzielten molaren Ausbeute. Nach 9 h liegt sie beispielsweise bei ca. 0,67, nach 18 h bei ca. 0,65 und nach 28 h bei 0,63 $\text{mol}_{1,3\text{-PD}} \cdot \text{mol}_{\text{Gly}}^{-1}$. Die Erklärung hierfür findet sich in der von Zeng et al. veröffentlichten Stoffwechselanalyse für *Clostridium butyricum* [Zeng 1996]. Dort wird berichtet, dass über die Bildung von Buttersäure theoretisch höhere ATP- und Biomasseausbeuten erzielt werden, wohingegen die Essigsäurebildung höhere Ausbeuten (bis zu 30 % im Vergleich zur Buttersäurebildung) an 1,3-Propandiol ermöglicht.

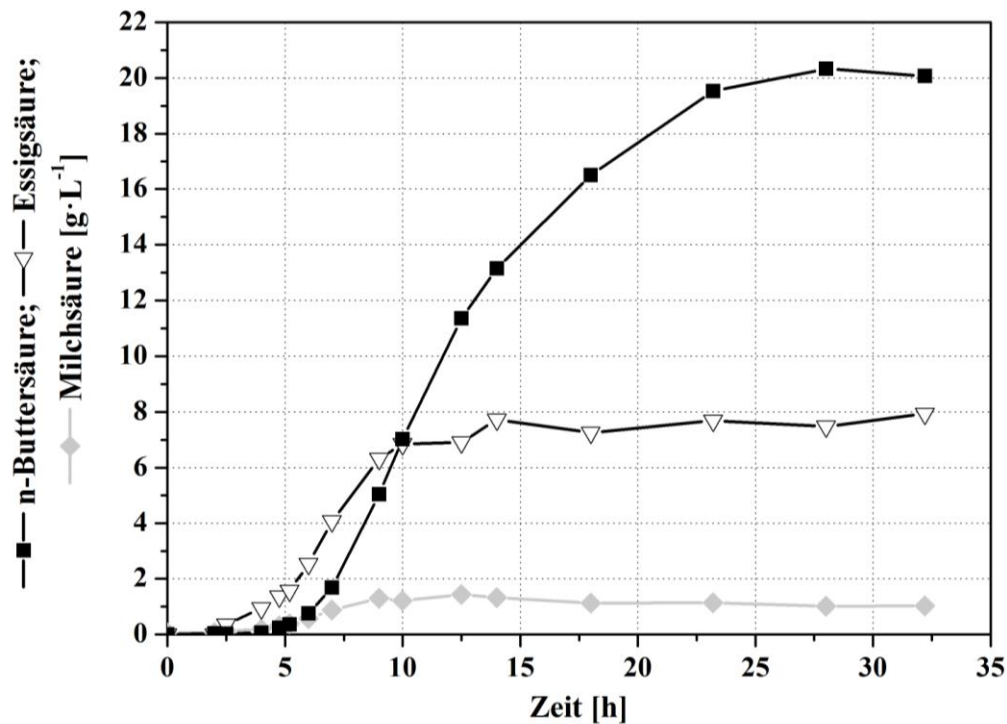


Abbildung 4.19: Nebenprodukte der Fed-Batch Fermentation von AKR 102a mit Pharmaglycerin und Hefeextrakt ($\text{HE}_{\text{ges}} 11 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) im 1 L-Maßstab

Die mit AKR 102a erzielte sehr hohe 1,3-PD-Konzentration von $93,7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ gekoppelt mit einer sehr hohen Gesamtproduktivität von $3,3 \text{ g}_{1,3\text{-PD}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ gehört zu den höchsten bisher publizierten Werten für natürliche 1,3-PD-Produzenten (siehe Tabelle 2.2). Zusammen mit der guten 1,3-PD-Ausbeute machen diese Eigenschaften den Stamm AKR 102a zu einem sehr vielversprechenden Produktionsstamm.

4.8 Einfluss einer Hefeextraktreduktion (AKR 102a)

Eine Möglichkeit zur Senkung der Prozesskosten besteht in der Verringerung des Anteils hochpreisiger Medienbestandteile, wie z. B. Hefeextrakt. Da AKR 102a sich bereits im

Rahmen des Screenings durch einen geringen Bedarf an Supplinen ausgezeichnet hat, wurde die Reduktion des Hefeextraktes im Fed-Batch Verfahren mit Pharmaglycerin ($\text{PG}^{25}\text{HE}^X$, 1 L-Maßstab) getestet. Auf den Einsatz von Rohglycerin wurde an dieser Stelle bewusst verzichtet um einen zusätzlichen Einflussfaktor ausschließen zu können.

Für die Referenzfermentation (siehe Kap. 4.7.4) ergibt sich, bezogen auf ihr Endvolumen, ein Gesamteinsatz an Hefeextrakt von ca. $11 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. Als erster Reduktionsschritt wurde auf den Hefeextrakt im Feed verzichtet und als weiterführende Reduktion die Startkonzentration zusätzlich von 5 auf $2,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ HE verringert. Die sich ergebenden Gesamteinsätze belaufen sich damit auf 4 bzw. $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Hefeextrakt bezogen auf das erreichte Endvolumen. Fermentationen bei denen die $4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Hefeextrakt über eine unterschiedliche Verteilung zwischen Startmedium und Feed (50 % zu 50 % bzw. 20 % zu 80 %) zugeführt wurden, lieferten vergleichbare Fermentationsergebnisse (Daten nicht dargestellt). Somit scheint der Zeitpunkt der Hefeextraktzugabe für die getesteten Konzentrationen nicht entscheidend zu sein.

Innerhalb der ersten 5 - 6 h der Fermentation ist auf Grund der geringen Zelldichte noch kein Einfluss der Halbierung des Startheefeextraktes zu erkennen (siehe Abbildung 4.20). Mit einsetzender Zufütterung des hefeextrakthaltigen Feeds wird die Phase der hohen 1,3-PD-Bildungsrate im Vergleich zu den Fermentationen ohne Hefeextraktnachführung deutlich verlängert. Hieraus resultiert ebenfalls eine höhere 1,3-PD-Endkonzentration. Da mit der Erhöhung der Hefeextraktmenge neben den Spurenelementen auch die Menge frei zur Verfügung stehender Aminosäuren, Vitamine und anderer biosynthetischer Vorstufen steigt, müssen diese von den Mikroorganismen nicht zeitaufwendig im Rahmen ihres Stoffwechsels selbst synthetisiert werden. Bei den Ansätzen ohne Hefeextraktnachfütterung verringert sich daher im Betrachtungszeitraum durch die Halbierung des Hefeextraktes sowohl die insgesamt erreichte 1,3-PD-Konzentration als auch die Produktivität (siehe Tabelle 4.5). Die Ausbeuten liegen jedoch für alle Fermentationen konstant auf einem Niveau von ca. $0,63 \text{ mol}_{1,3\text{-PD}} \cdot \text{mol}_{\text{Gly}}^{-1}$.

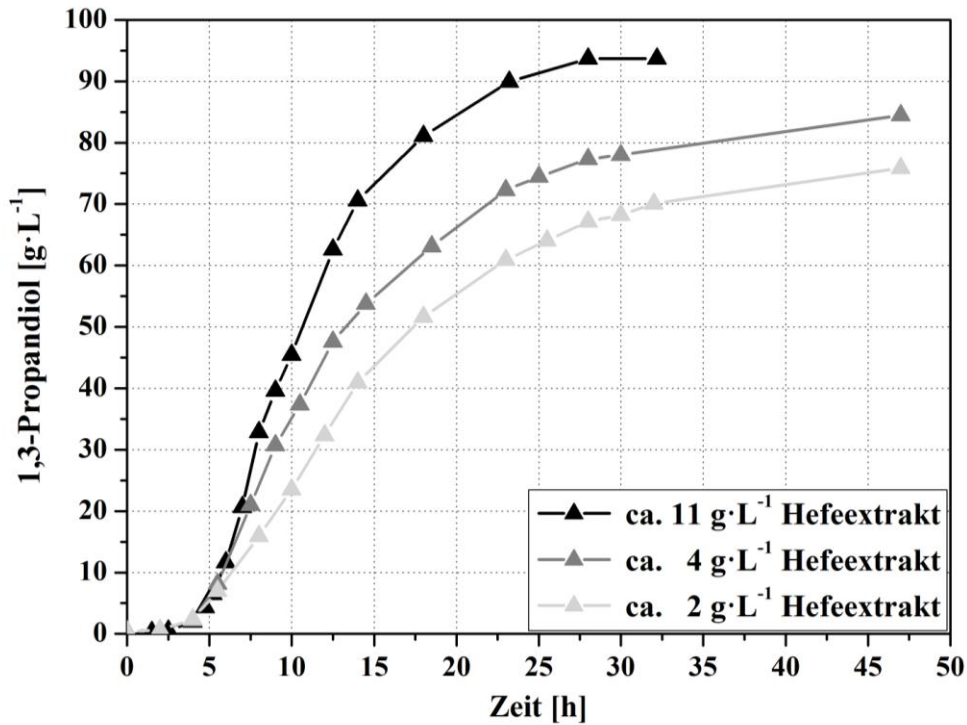


Abbildung 4.20: 1,3-PD-Konzentrationen bei Fed-Batch Kultivierungen von AKR 102a mit Pharmaglycerin und verschiedenen HE-Gesamteinsätzen

Tabelle 4.5: Ergebnisse der Hefeextraktreduktion bei Kultivierung von AKR 102a mit Pharmaglycerin

Gesamteinsatz	11 g·L ⁻¹ HE	4 g·L ⁻¹ HE	2 g·L ⁻¹ HE
Zeit [h]	28	47 (30)	47 (32)
1,3-PD [g·L ⁻¹]	93,7	84,5 (78)	75,8 (70,1)
Q_{ges} [g _{1,3-PD} · L ⁻¹ · h ⁻¹]	3,3	1,8 (2,6)	1,6 (2,2)
Q_{max} [g _{1,3-PD} · L ⁻¹ · h ⁻¹]	8,1	6,5	4,4
Y [g _{1,3-PD} · g _{Gly} ⁻¹]	0,522	0,526	0,521
Y [mol _{1,3-PD} · mol _{Gly} ⁻¹]	0,633	0,636	0,631

Anhand der Ergebnisse ist erkennbar, dass sich die Abnahme der 1,3-PD-Konzentration nicht proportional zu Reduktion des Hefeextraktes verhält (siehe Abbildung 4.21). Legt man ein Fermentationsende nach 30 h zu Grunde, führte eine Verringerung des Hefeextraktes von 100 % (11 g·L⁻¹) auf ca. 36 % (4 g·L⁻¹) zu 83 % der Referenzkonzentration an 1,3-PD. Bis zum Fermentationsabbruch nach 47 h erhöht sich dieser Wert sogar auf 90 %. Für eine

Reduktion des Hefeextraktes auf 18 % ($2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) ergeben sich nach 32 h 75 % und nach 47 h 81 % der Referenzkonzentration an 1,3-PD.

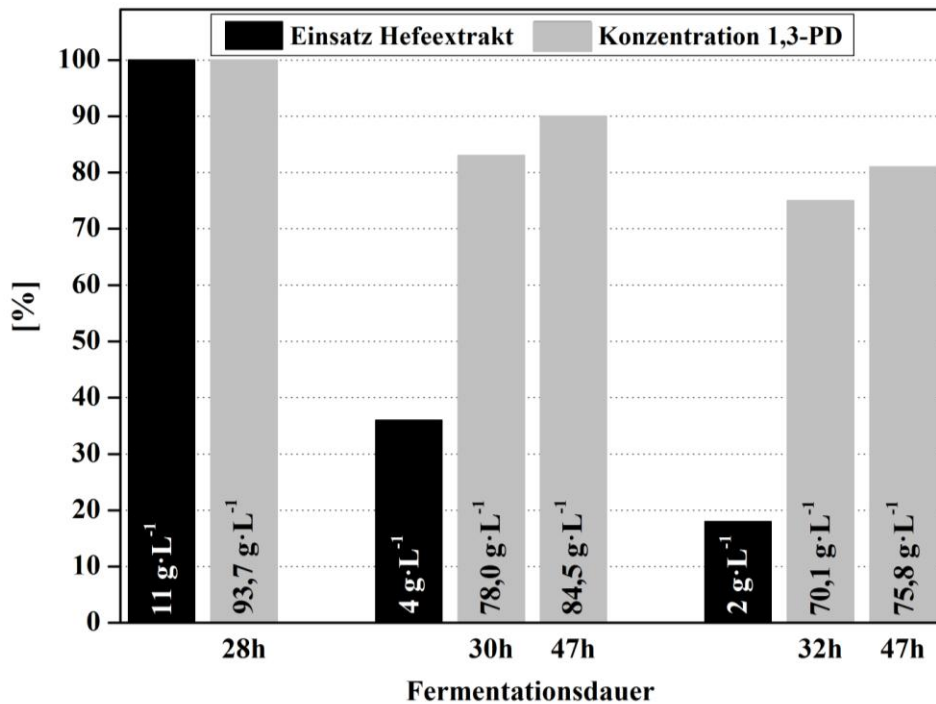


Abbildung 4.21: Prozentuales Verhältnis von HE-Gesamteinsatz zu erzielter 1,3-Propandiolkonzentration für Pharmaglycerinfermentationen mit AKR 102a

Durch Reduzierung des Hefeextraktes können bei nur geringen Einbußen der 1,3-PD-Endkonzentration die Medienkosten merklich gesenkt werden. Dabei muss im Hinblick auf die gesamten Prozesskosten eine Abwägung zwischen der Verlängerung der Prozessdauer und steigenden Aufarbeitungskosten sowie der Kostenreduktion durch Rohstoffeinsparungen vorgenommen werden.

4.9 Einfluss von Rohglycerin (AKR 102a)

Das im Vergleich zu Hefeextrakt weitaus größere Kostenreduktionspotenzial besteht in der Nutzung preiswerter Rohglycerine. Im Zuge der Prozessumstellung der Biodieselproduktion in Schwarzheide (siehe Kap. 3.2.5) wurde für Versuche mit AKR 102a ein neue Charge Rohglycerin (K602) zu Verfügung gestellt. Deren Eignung wurde für die 1,3-PD-Produktion getestet.

4.9.1 Vorbehandlung der Rohglycerine

Es wurde bereits gezeigt, dass sich der Einsatz von Rohglycerin ohne die sich absetzende fettsäurehaltige Schwimmschicht als vorteilhaft erwiesen hat (siehe Kap. 4.4.2). Auf Grund dieser Ergebnisse wurde nach weiteren Rohglycerin-Aufarbeitungsmöglichkeiten zur Prozessoptimierung gesucht. Hierfür wurden nach dem Abtrennen der Schwimmschicht verschiedene Substanzen getestet (siehe Kap. 3.2.8). Das Wachstum auf $\text{RG}_{\text{K602}}^{25}\text{HE}^2_{\text{Vial}}$ mit unterschiedlich vorbehandeltem Rohglycerin K602 im 96-Well-Mikrotitermaßstab findet sich in Abbildung 4.22.

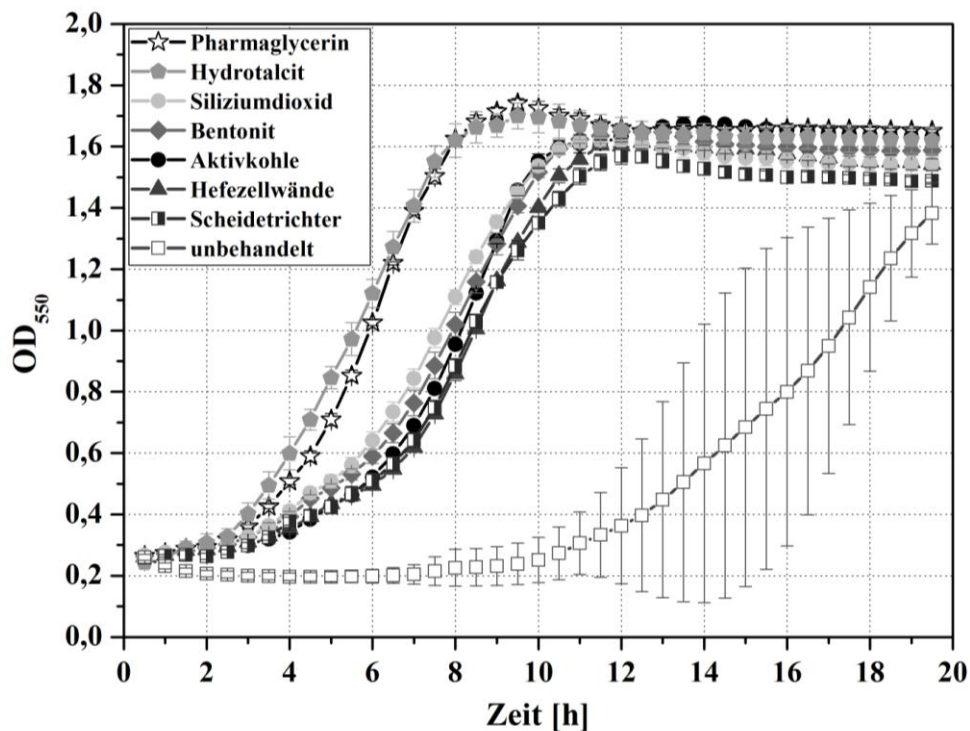


Abbildung 4.22: Verlauf OD_{550} bei Kultivierung von AKR 102a auf $\text{RG}_{\text{K602}}^{25}\text{HE}^2_{\text{Vial}}$ mit unterschiedlich vorbehandeltem Rohglycerin K602 im 96-Well-Mikrotitermaßstab

Das technisch einfach zu realisierende Abtrennen der Schwimmschicht mittels Scheidetrichter führte für das getestete Rohglycerin K602 bereits zur einer signifikanten Verbesserung des Wachstums. Im Vergleich hierzu resultierte der anschließende Einsatz der meisten getesteten Substanzen nur in einer marginalen weiteren Verbesserung. Durch die Vorbehandlung mit Hydrotalcit konnte hingegen unter den gewählten Testbedingungen ein zu Pharmaglycerin vergleichbares Wachstum erreicht werden. Der Einsatz von Hydrotalcit nach dem Abtrennen der Schwimmschicht stellt somit die erfolgsversprechende Aufarbeitungsmethode dar.

Die Ursache für die positive Wirkung des Hydrotalcits ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht genau bekannt. Hydrotalcit ist in der Lage nach thermischer Aktivierung als Anionensorbenz bzw. -tauscher zu fungieren. Eine Elementarbestimmung (ICP) einer Rohglycerinprobe vor und nach Hydrotalcit-Behandlung zeigte einen Anstieg des Magnesiumgehaltes von 0,012 auf ca. $0,18 \text{ mg} \cdot \text{g}_{\text{RG}}^{-1}$. Dies resultiert aus nicht vollständig abgetrenntem Hydrotalcit und seiner Natur als Magnesium-Aluminium-Hydroxycarbonat. Der bestimmbare Magnesiumgehalt ist daher stark davon abhängig zu welchem Grad das eingesetzte sehr feine Hydrotalcitpulver wieder abgetrennt werden kann. Inwiefern sich der Gehalt deutlich geringer konzentrierter Elemente verändert hat, ließ sich in Folge der nur in einer niedrigen Konzentration vermessbaren Rohglycerinlösung ($< 1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) nicht eindeutig ermitteln (ICP-Daten nicht weiter dargestellt). Eine zusätzliche Analyse der Versuchsansätze durch die Biopetrol Schwarzheide GmbH ergab zusätzlich die in Tabelle 4.6 und Tabelle 4.7 dargestellten Ergebnisse.

Tabelle 4.6: Analysewerte vorbehandeltes Rohglycerin K602 (Biopetrol Schwarzheide GmbH)

	Scheidetrichter	Scheidetrichter + Hydrotalcit
Chlorid [ppm]	36824	34472
Chlorid [%]	3,70	3,50
pH	6,0	8,0
Fettsäure [%]	<0,5	<0,5
Asche [%]	3,70	3,47

Im Vergleich zur Analyse des ursprünglich gelieferten Rohglycerins (siehe Tabelle 3.6) fällt auf, dass durch die Abtrennung der Schwimmschicht (Scheidetrichter) eine Reduktion des Fettsäuregehaltes von 1 auf unter 0,5 % erreicht werden konnte. Im direkten Vergleich der vorbehandelten Rohglycerinansätze werden auch eine leichte Reduktion des Aschegehaltes sowie eine pH-Verschiebung ins Alkalische erkennbar. Die Verringerung der Chloridkonzentration bestätigt die anionensorbierende Wirkung des thermisch aktivierten Hydrotalcits.

Tabelle 4.7: GC-Fettsäureanalyse vorbehandeltes Rohglycerin K602 (Biopetrol Schwarzheide GmbH)

		Scheidetrichter		Scheidetrichter + Hydrotalcit	
	Fettsäure	[Area]	[Area %]	[Area]	[Area %]
C-14	Myristinsäure	11	0,63	13	0,80
C-16	Palmitinsäure	132	7,57	149	9,46
C-18	Stearinsäure	22	1,28	67	4,23
C-18:1	Ölsäure	1018	58,38	1045	66,43
C-18:2	Linolsäure	169	9,71	182	11,57
C-18:3	Linolensäure	65	3,71	55	3,48
C-20	Arachinsäure	1	0,08	5	0,34
C-20:1	Eicosensäure	6	0,34	22	1,39
C-22	Behensäure	10	0,57	2	0,10
C-22:1	Erucasäure	14	0,83	34	2,19
C-24	Lignocersinsäure	141	8,09	-	-
C-24:1	Nervonsäure	154	8,82	-	-
Summe		1743	100	1574	100

Betrachtet man die Fettsäuren bis zu einer Kohlenstoffkettenlänge von 22 stellt die einfach ungesättigte Ölsäure (C-18:1) mit ca. 60 % den größten Anteil. Ebenfalls in höheren Anteilen vorhanden sind die gesättigte Palmitinsäure (C-16) gefolgt von der mehrfach ungesättigten Linolsäure (C-18:2). Dies deckt sich mit den Angaben des Fettsäureprofils für ein beispielhaftes Rapsöl (*Brassica napus*) [Dubios et al. 2007] oder z. B. dem von Chatzifragkou untersuchten Rohglycerin aus einer Biodiesel-Produktion [Chatzifragkou et al. 2010]. Bei Betrachtung von Tabelle 4.7 fällt auf, dass nach einer Behandlung mit Hydrotalcit die C-24 Fettsäuren nicht mehr wiedergefunden werden. Inwieweit dies auf die Hydrotalcit-Behandlung zurückzuführen ist, kann nicht abschließend geklärt werden. Die Zusammensetzung und Menge der restlichen Fettsäuren wird nicht merklich beeinflusst.

Um den Wirkmechanismus hinter dem positiven Effekt der Hydrotalcit-Behandlung besser verstehen zu können, bedarf es weiterführender Untersuchungen. Hieraus könnten sich potenziell neue Optimierungsschritte für die Rohglycerinvorbehandlung ableiten lassen.

4.9.2 Fermentation von mit Hydrotalcit vorbehandeltem Rohglycerin K602

Die Anwendbarkeit des nach Abtrennung der Schwimmschicht mit Hydrotalcit vorbehandelten Rohglycerins wurde in einer Fed-Batch Fermentation unter Standardbedingungen ($\text{RG}_{\text{K602}}^{25}\text{HE}^5$, 1 L-Maßstab) getestet. Als Feed kam hierbei das unverdünnte vorbehandelte Rohglycerin K602 mit $40 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Hefeextrakt zum Einsatz. Der Gesamtheferextrakteinsatz belief sich auf ca. $12 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Für die pH-Regelung wurde 10 M NaOH eingesetzt.

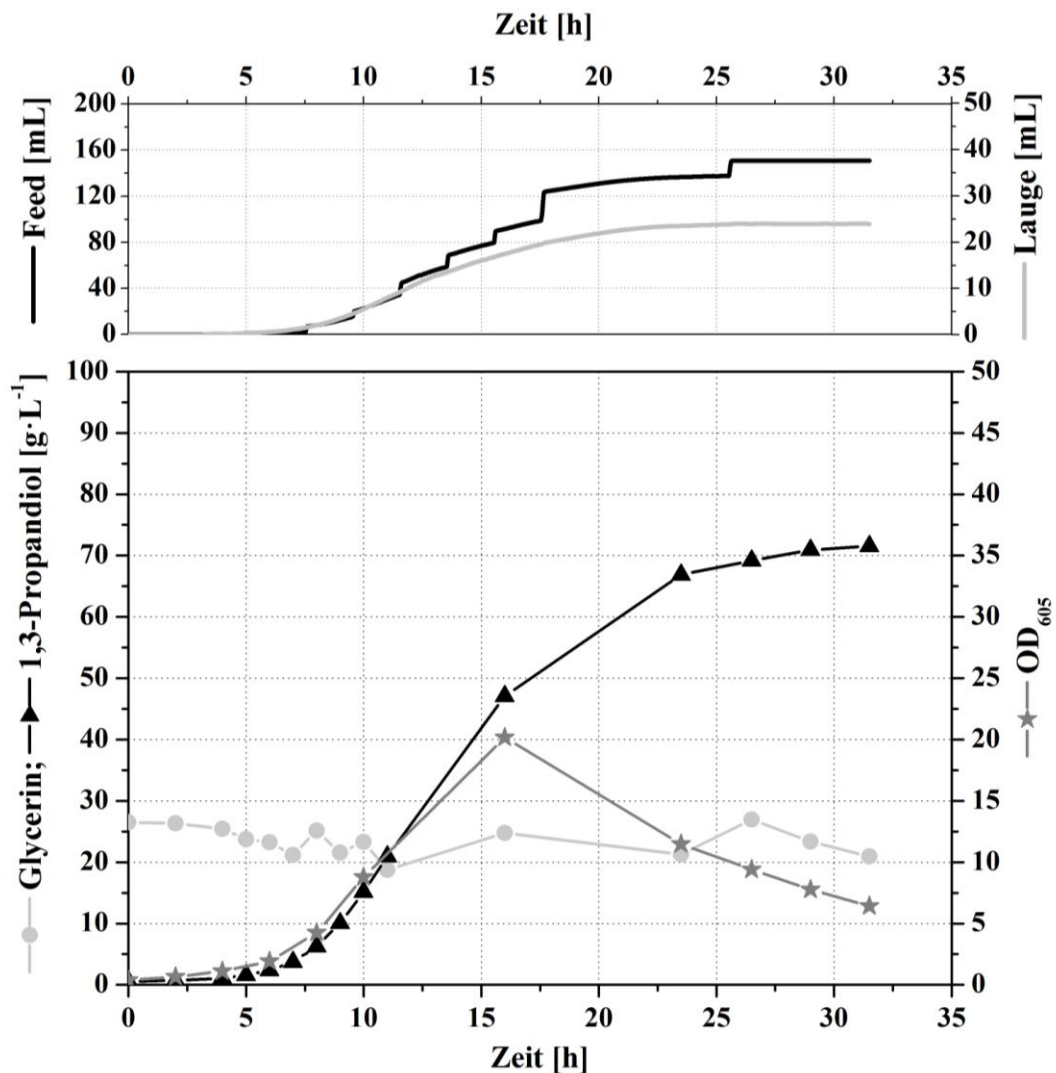


Abbildung 4.23: Fed-Batch Fermentation von AKR 102a mit vorbehandeltem Rohglycerin K602 und Hefeextrakt ($\text{HE}_{\text{ges}} 12 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) im 1 L-Maßstab

Die Glycerinkonzentration betrug zu Versuchsbeginn $26,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Nach Überschreitung einer 1,3-PD-Konzentration von ca. $50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ist ein starker Abfall der Produktivität zu erkennen (siehe Abbildung 4.23). Die maximale Konzentration von $71,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 1,3-PD wird bei einem

verbleibenden Glycingehalt von $20,9 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ nach 31,5 h erzielt. Die Gesamtproduktivität liegt somit bei ca. $2,3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ mit einer maximalen Produktivität von $5,3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Diese Werte liegen damit unter denen der PG-Referenzfermentation (siehe Tabelle 4.8). Die Ausbeuten erreichen mit Werten von $0,501 \text{ g}_{1,3\text{-PD}} \cdot \text{g}_{\text{Gly}}^{-1}$ bzw. $0,606 \text{ mol}_{1,3\text{-PD}} \cdot \text{mol}_{\text{Gly}}^{-1}$ ebenfalls ein geringes Niveau.

Tabelle 4.8: Ergebnisse der Fed-Batch Fermentationen von AKR 102a mit PG oder vorbehandeltem RG K602 und Hefeextrakt

	PG	K602
Zeit [h]	28	31,5
1,3-PD _{end} [$\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$]	93,7	71,5
Glycerin _{end} [$\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$]	6,4	20,9
Q_{ges} [$\text{g}_{1,3\text{-PD}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$]	3,3	2,3
Q_{max} [$\text{g}_{1,3\text{-PD}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$]	8,1	5,3
Y [$\text{g}_{1,3\text{-PD}} \cdot \text{g}_{\text{Gly}}^{-1}$]	0,522	0,501
Y [$\text{mol}_{1,3\text{-PD}} \cdot \text{mol}_{\text{Gly}}^{-1}$]	0,633	0,606

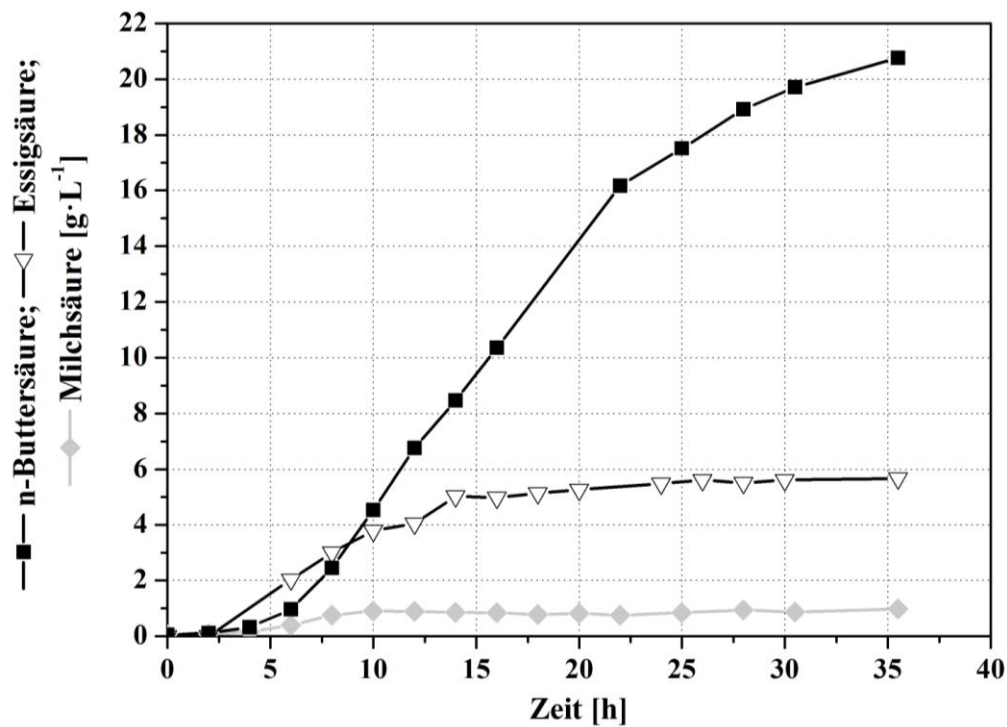


Abbildung 4.24: Nebenprodukte der Fed-Batch Fermentation von AKR 102a mit vorbehandeltem Rohglycerin K602 und Hefeextrakt ($\text{HE}_{\text{ges}} 12 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) im 1 L-Maßstab

Analog zu den bisherigen Ergebnissen beginnt die Bildung der Nebenprodukte (siehe Abbildung 4.24) mit Essigsäure gefolgt von Buttersäure. Die dabei erreichten Konzentrationen liegen bei 5,7 respektive 20,8 g·L⁻¹. Eine bedeutende Produktion von Milchsäure tritt nicht auf und führt zu einer Endkonzentration von ca. 1 g·L⁻¹. Das Verhältnis von produzierten Säuren (Essig-, Butter- und Milchsäure) zu 1,3-Propandiol entspricht mit einem Wert von ca. 0,3 mol_{Säuren}·mol_{1,3-PD}⁻¹ in etwa dem der Fermentation mit Pharmaglycerin (siehe Kap. 4.7.4).

Wie schon zuvor für AKR 17a und Rohglycerin K501 (siehe Kap. 4.4.2) sind die im Vergleich zu Pharmaglycerin schlechteren Resultate wahrscheinlich primär auf Verunreinigungen des Rohglycerins, wie z. B. Fettsäuren, Schwermetallionen oder Salze zurückzuführen. Beispielsweise berichten Chatzifragkou et. al. für *Clostridium butyricum* VPI 1718 ab Ölsäurekonzentrationen von ca. 0,1 g·L⁻¹ über eine Verlängerung der lag-Phase und ab ca. 0,25 g·L⁻¹ über eine nahezu vollständige Wachstumsinhibierung [Chatzifragkou et al. 2010]. Für eine angestrebte 1,3-PD-Konzentration von 75 g·L⁻¹ werden ca. 300 g·L⁻¹ Rohglycerin benötigt. In Anbetracht eines potenziellen Restfettsäuregehaltes von bis zu 0,5 % und der Fettsäureverteilung (siehe Tabelle 4.7) ist davon auszugehen, dass diese Werte im Verlauf der Fermentation erreicht werden.

4.9.3 Vergleich vorbehandelter Rohglycerine (K501 & K602)

Neben der Vorbehandlung bzw. Aufarbeitung des Rohglycerins stellt die Anpassung des Mediums und anderer Prozessparameter (z. B. der Lauge) eine zweite Möglichkeit zur Verbesserung des Fermentationsergebnisses dar. Als Ausgangspunkt der Optimierung wurde das von der Biopetrol Schwarzheide GmbH gelieferte Rohglycerin vor (K501) und nach (K602) Prozessumstellung (siehe Kap. 3.2.5) verglichen. Hierfür erfolgte eine identische Vorbehandlung durch Entfernung der Schwimmschicht mittels Scheidetrichter und anschließender Hydrotalcit-Behandlung. Das Wachstum auf verschiedenen Rohglycerinkonzentrationen ($RG_X^X HE^2_{Vial}$) wurde im 96-Well-Mikrotitermaßstab untersucht. Da die Rohglycerine im Gegensatz zu Pharmaglycerin geringere Glycerinkonzentrationen besitzen, beziehen sich die in Abbildung 4.25 und Abbildung 4.26 dargestellten Konzentrationsangaben auf die tatsächlich eingesetzte Glycerinkonzentration und nicht auf die Menge Rohglycerin.

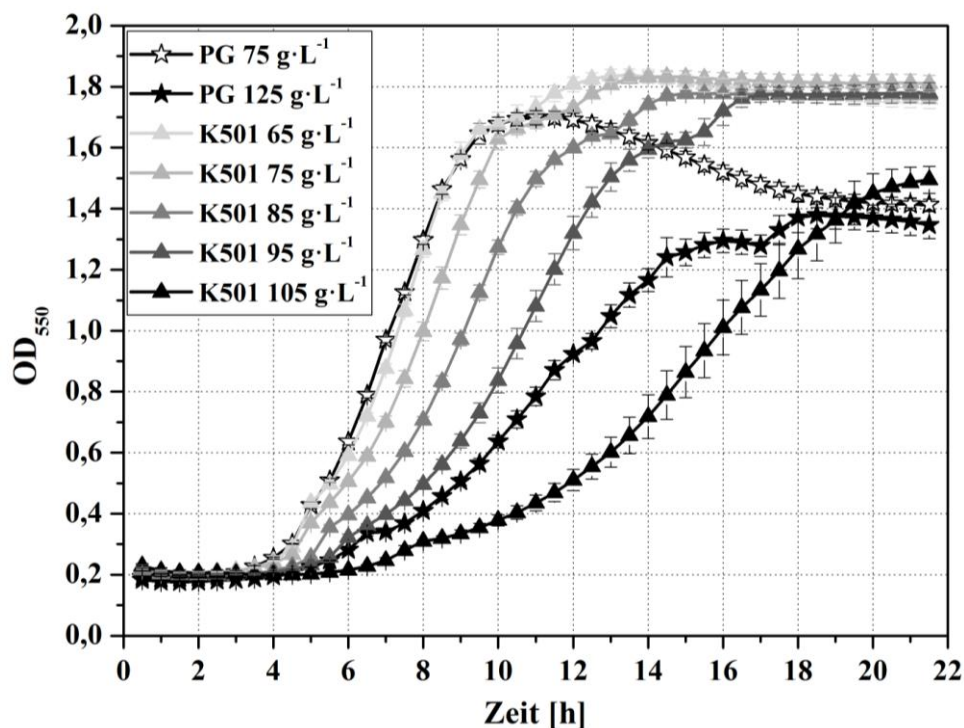


Abbildung 4.25: Verlauf OD_{550} bei Kultivierung von AKR 102a auf $RG_X^X HE^2_{Vial}$ mit vorbehandeltem Rohglycerin K501 (Scheidetrichter, Hydrotalcit)

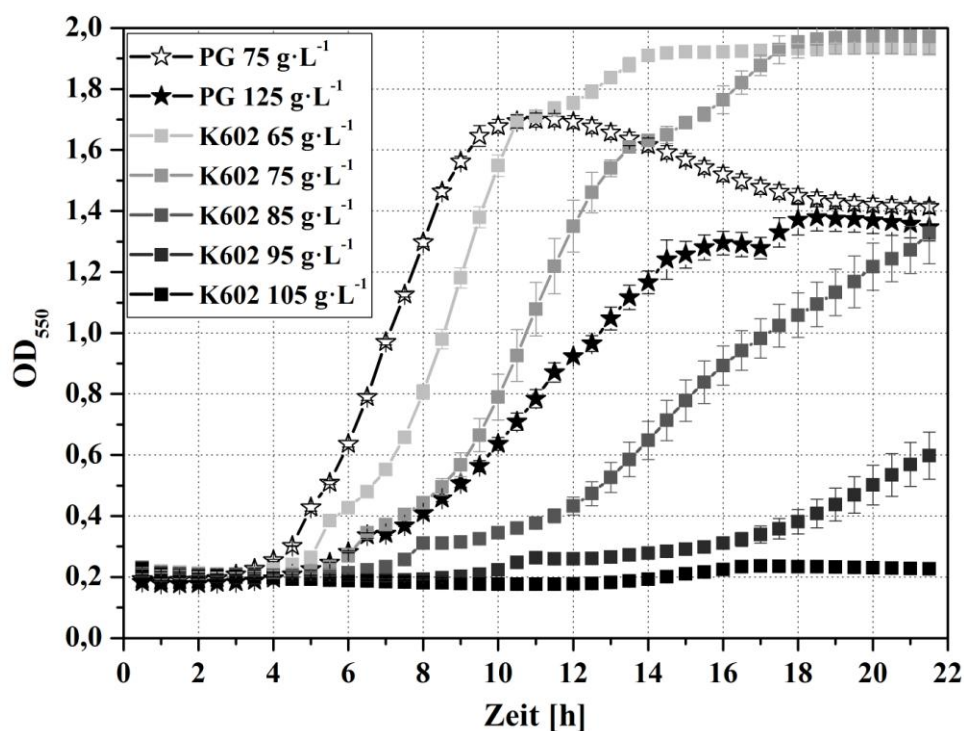


Abbildung 4.26: Verlauf OD_{550} bei Kultivierung von AKR 102a auf $RG_X^X HE^2_{Vial}$ mit vorbehandeltem Rohglycerin K602 (Scheidetrichter, Hydrotalcit)

Tabelle 4.9: Maximale Zunahme der optischen Dichte bei Kultivierung von AKR 102a mit vorbehandeltem Rohglycerin K501 bzw. K602

Glycerin [g·L ⁻¹]	PG		K501		K602	
	Zeit [h]	$\Delta OD_{550} \cdot h^{-1}$	Zeit [h]	$\Delta OD_{550} \cdot h^{-1}$	Zeit [h]	$\Delta OD_{550} \cdot h^{-1}$
65	-	-	6 - 8	0,34	8 - 9,5	0,38
75	6 - 8	0,33	7 - 9	0,32	10 - 11,5	0,29
85	-	-	8,5 - 10	0,28	13 - 15	0,13
95	-	-	10 - 12	0,24	19 - 21	0,07
105	-	-	14 - 16	0,15	k.W.	k.W.
125	10 - 11,5	0,16	-	-	-	-

k.W. = kein Wachstum

Wie zu erwarten, kommt es mit einer steigenden Glycerinkonzentration zu einer Verlängerung der lag-Phase bei gleichzeitiger Verringerung der maximalen Wachstumsgeschwindigkeit (siehe Tabelle 4.9). Ebenso werden deutlich höhere Pharmaglycerinkonzentrationen besser toleriert als die entsprechende Menge Rohglycerin. Eine Konzentration von 25 g·L⁻¹ Glycerin resultierte dagegen noch in einem für Pharmaglycerin und vorbehandeltes RG K602 identischen Wachstum (siehe Abbildung 4.22). Für 65 g·L⁻¹ Glycerin liefern beide Rohglycerine vergleichbare Ergebnisse (siehe Abbildung 4.25 und Abbildung 4.26). Für höhere Konzentrationen werden jedoch starke Abweichungen sichtbar. Die Beeinträchtigung des Wachstums durch Rohglycerin K602 wiegt dabei signifikant schwerer als die durch K501. Bereits ab einer Vorlage von 75 g·L⁻¹ Glycerin in Form von K602 wird das Wachstum sehr deutlich negativ beeinflusst (siehe Abbildung 4.26). Im Gegensatz zu Rohglycerin K501 ist für K602 bei einer Glycerinkonzentration von 105 g·L⁻¹ im Beobachtungszeitraum keine Zunahme der optischen Dichte mehr zu beobachten.

Eine vergleichende ICP-Messung (siehe Kap. 3.3.5) für die Rohglycerine ohne Schwimmschicht ergab die in Tabelle 4.10 gezeigten Ergebnisse. Da die Rohglycerinlösungen analytikbedingt nur in geringen Konzentrationen vermessen werden konnten, wird auf die Darstellung der Messergebnisse für niedrig konzentrierte Substanzen wie Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Wo und Zn verzichtet. Zusätzlich ist der Chloridgehalt aus dem Lieferzertifikat von K501 bzw. die Nachmessung von Biopetrol für das Rohglycerin K602 ohne Schwimmschicht aufgeführt.

Tabelle 4.10: Elementkonzentrationen für Rohglycerin K501 und K602

$[\text{mg} \cdot \text{g}_{\text{RG}}^{-1}]$	K501	K602
Ca	0,0125	0,0605
K	6,4266	0,0613
Mg	0,0267	0,0116
Na	9,4762	15,3864
S	12,0431	-
Chlorid [ppm]*	10	36824

* Analyse Biopetrol

Die ermittelten Elementkonzentrationen spiegeln sehr deutlich die Umstellung des Prozesskatalysators von Kalium- auf Natriummethylat sowie von Schwefel- auf Salzsäure innerhalb des Ansäuerungsschrittes der Glycerinaufarbeitung wieder (siehe Abbildung 2.9). Da beide Rohglycerine für den Wachstumsversuch im 96-Well-Mikrotitermaßstab identisch aufbereitet wurden, könnte die stark hemmende Wirkung von RG K602 durch die prozessbedingt deutlich gestiegene Salzkonzentration (NaCl) verursacht werden. Gegen eine Mangelsituation der niedrig konzentrierten Substanzen wie Schwefel, Magnesium und Kalium spricht, dass diese über das Mineralsalzmedium und den Hefeextrakt in ausreichenden Mengen bereitgestellt werden.

4.9.4 Hemmung durch NaCl

In Folge der vermuteten hemmenden Wirkung durch erhöhte Salzkonzentrationen wurde der Einfluss von Chlorid bzw. Natriumchlorid auf die 1,3-PD-Produktion von AKR 102a im Vialmaßstab ($\text{PG}^{25}\text{HE}^1_{\text{Vial}}$) untersucht. Die erhaltenen 1,3-PD-Konzentrationen finden sich in der folgenden Abbildung 4.27.

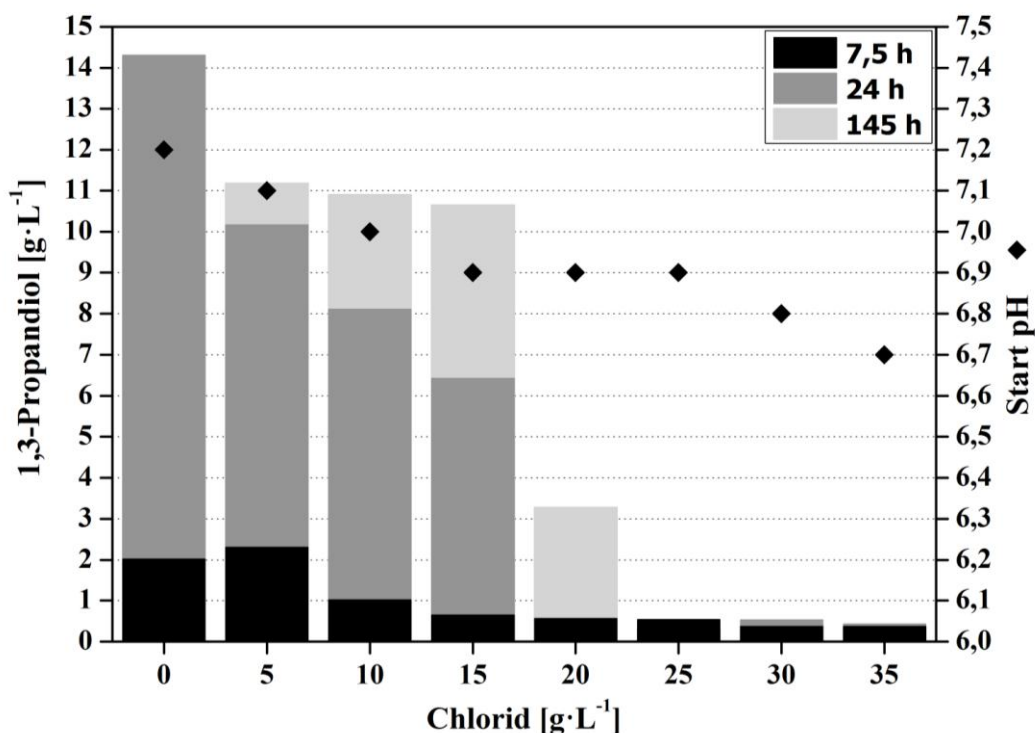


Abbildung 4.27: 1,3-PD-Konzentration bei Kultivierung von AKR 102a mit $\text{PG}^{25}\text{HE}^1_{\text{vial}}$ und unterschiedlichen Chloridgehalten in Form von NaCl

Mit zunehmender NaCl-Konzentration sinkt der Start-pH-Wert der jeweiligen Versuchsansätze. In dem hier gezeigten pH-Bereich hat dies jedoch nur einen geringen Einfluss auf die Wachstumsgeschwindigkeit (siehe Anhang Abbildung 6.3). Es zeigt sich, dass bereits eine Zugabe von $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Chlorid (ca. $8,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl) eine merkliche Beeinträchtigung der 1,3-PD-Bildung von AKR 102a zur Folge hat. Mit steigender Salzkonzentration verlangsamt sich das Wachstum und in Folge dessen die Bildung von 1,3-PD weiter. Im Übergang von 15 zu $25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Chlorid (ca. $24,7 - 41,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl) kommt das Wachstum bei identischen Start-pH-Werten nahezu vollständig zum Erliegen. Nimmt man den Laugen- und Feedverbrauch der Rohglycerinfermentation mit AKR 102a (siehe Kap. 4.9.2) als Berechnungsgrundlage, ergeben sich die in Tabelle 4.11 dargestellten Größenordnungen für die Konzentrationen an Natrium und Chlorid, die zum Ende der Fermentation in etwa erreicht werden. Der Berechnung liegt dabei eine gemittelte Chloridkonzentration von $35 \text{ g}\cdot\text{L}_{\text{RG K602}}^{-1}$ bzw. eine Natriumkonzentration von $13,3 \text{ g}\cdot\text{L}_{\text{RG K602}}^{-1}$ ($15,5 \text{ mg}\cdot\text{g}_{\text{RG K602}}^{-1}$) zu Grunde. Der geringe NaCl-Gehalt des Hefeextrakts ($< 50 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$) wird für die Darstellung vernachlässigt.

Tabelle 4.11: Berechnete Natrium- bzw. Chloridkonzentration zum Fermentationsende bei Fed-Batch Fermentation von Rohglycerin K602

	Na [g·L ⁻¹]	Cl [g·L ⁻¹]
Medium (NH ₄ Cl)	-	1,6
Vorgelegtes Rohglycerin K602	0,6	1,1
Lauge (10 M NaOH)	8,2	-
Feed Rohglycerin K602	4,0	7,5
Summe	12,8	10,2

Es wird deutlich, dass zum Ende der Fermentation ein Natriumgehalt von 12 g·L⁻¹ überschritten wird. Laut Colin [Colin et al. 2001] ist damit bereits eine wachstumsinhibierende Konzentration erreicht. Ebenso führten 10 g·L⁻¹ Chlorid (bzw. 16,5 g·L⁻¹ NaCl) im Vialmaßstab bereits zu einer merklichen Verlangsamung der 1,3-PD-Produktion.

Eine mögliche Reduzierung des Salzgehaltes im Rahmen der Fermentationsvorbereitung stellt einen aufwendigen Aufarbeitungsschritt dar und würde den Kostenvorteil des Rohglycerineinsatzes deutlich verringern. Aus diesem Grund wird der Ansatz verfolgt den weiteren Eintrag von Natriumchlorid über Prozessmodifikationen zu minimieren. Hierfür wird die Lauge von einer 10 M Natriumhydroxidlösung auf eine 25 %ige Ammoniaklösung (Rotipuran[®], Carl-Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D) umgestellt. Des Weiteren wird das NH₄Cl des Fermentationsmediums durch (NH₄)₂SO₄ ersetzt um zusätzlich den Chloridgehalt zu reduzieren. Der Stickstoffgehalt wird hierbei konstant gehalten. Diese Optimierung wird anschließend im Fermentationsmaßstab überprüft.

4.9.5 Optimierte Rohglycerinfermentation

Die Umsetzung des nach Abtrennung der Schwimmschicht mit Hydrotalcit vorbehandelten Rohglycerins K602 wurde mit den oben genannten Modifikationen (Ammoniaklsg., (NH₄)₂SO₄) unter Standardbedingungen (RG_{K602}²⁵HE⁵, 1 L-Maßstab) getestet. Als Feed kam hierbei das unverdünnte vorbehandelte Rohglycerin K602 mit 40 g·L⁻¹ Hefeextrakt zum Einsatz. Der Gesamtheefeextrakteinsatz belief sich auf ca. 10,5 g·L⁻¹. In Abbildung 4.28 ist diese optimierte Fed-Batch Fermentation von AKR 102a dargestellt.

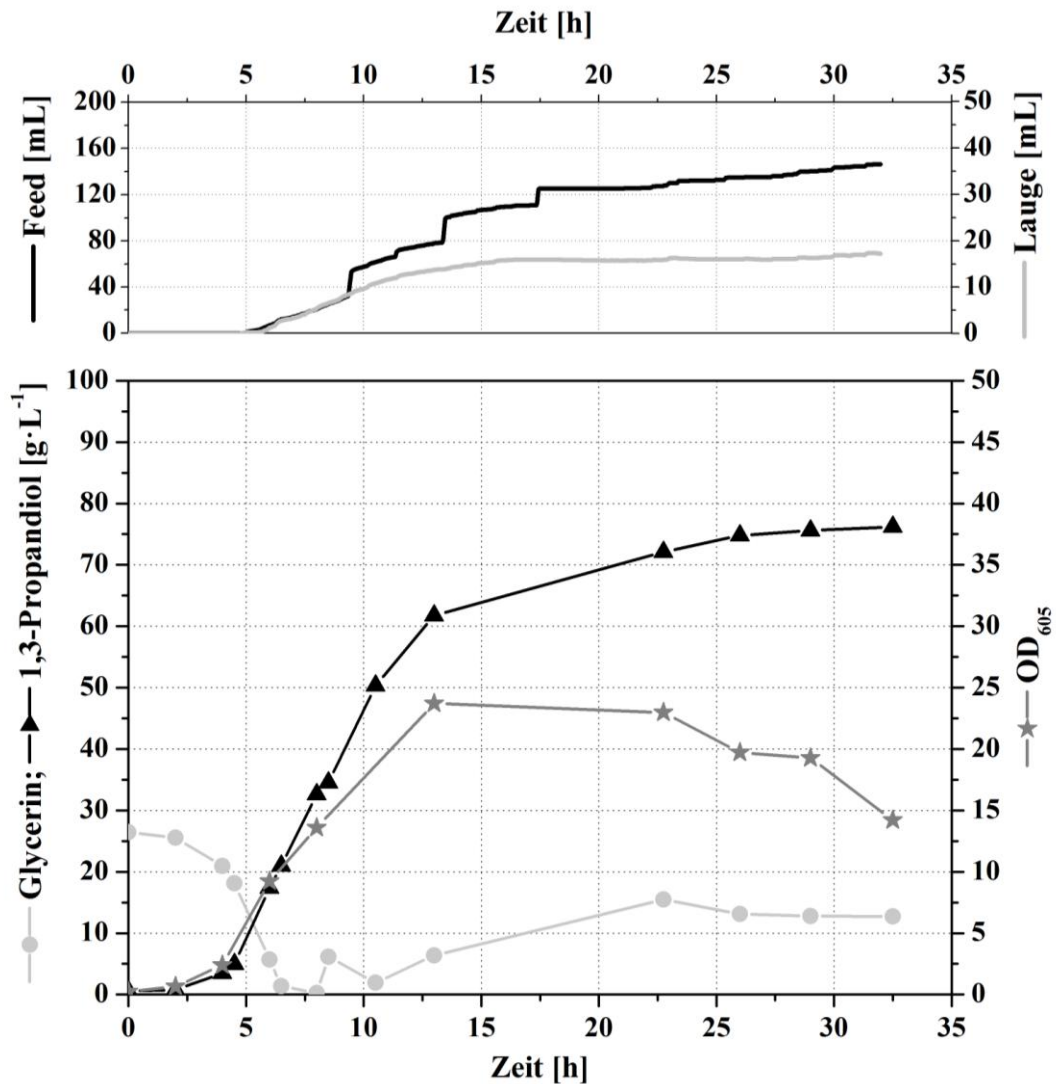


Abbildung 4.28: Optimierte Fed-Batch Fermentation von AKR 102a mit vorbehandelten Rohglycerin K602 und Hefeextrakt ($\text{HE}_{\text{ges}} 10,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) im 1 L-Maßstab

Die Fermentation wurde mit $26,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Glycerin gestartet. Die Abschnitte niedriger Glycerinkonzentrationen resultieren aus der Anpassung der Prozessführung an die im Vergleich zur vorangegangenen Fermentation höhere Wachstumsgeschwindigkeit (siehe Kap. 4.9.2). Als Folge der Prozessmodifikationen (Wechsel der Lauge, Ersatz des NH_4Cl) und der Hydrotalcit-Vorbehandlung konnte zu Beginn der Fermentation (bis ca. 12 h) für Rohglycerin K602 eine mit Pharmaglycerin (siehe Abbildung 4.18) vergleichbare Produktivität erzielt werden. Diese erreicht bei einer Fermentationszeit von 4 - 10 Stunden einen Maximalwert von $7,6 \text{ g}_{1,3\text{-PD}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Nach Überschreitung einer 1,3-PD-Konzentration von ca. $60 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ist ein starker Abfall der Produktivität zu erkennen. Die maximale Konzentration von $76,2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 1,3-PD wird bei einem verbleibenden Glyceringehalt von $12,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ nach 32,5 h erzielt. Neben einer etwas geringeren Gesamtproduktivität von $2,3 \text{ g}_{1,3\text{-PD}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ entsprechen die

erzielten Ausbeuten von $0,514 \text{ g}_{1,3\text{-PD}} \cdot \text{g}_{\text{Gly}}^{-1}$ bzw. $0,622 \text{ mol}_{1,3\text{-PD}} \cdot \text{mol}_{\text{Gly}}^{-1}$ der Nutzung von Pharmaglycerin. Dies gilt ebenso für die Reihenfolge der Nebenproduktbildung (siehe Abbildung 4.29) und die Essigsäurekonzentration von $7,7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. Einen merklichen Unterschied stellen die vergleichsweise geringe Buttersäurekonzentration von $12,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ und der kontinuierliche Anstieg der Milchsäurekonzentration bis auf $6,0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ dar.

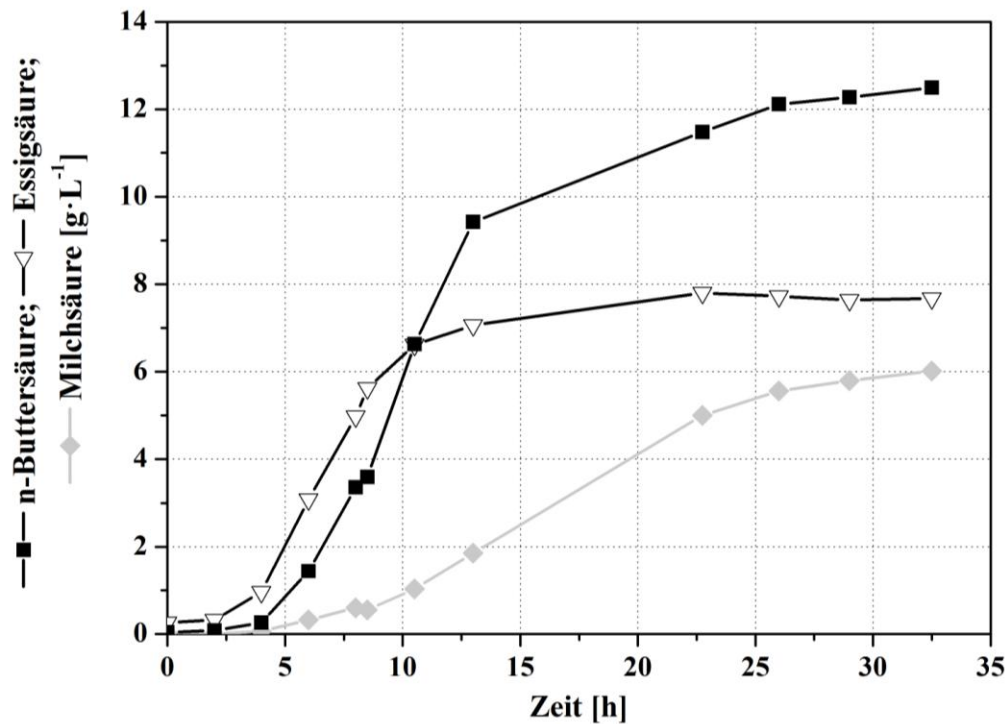


Abbildung 4.29: Nebenprodukte der optimierten Fed-Batch Kultivierung von AKR 102a mit vorbehandeltem Rohglycerin K602 und Hefeextrakt ($\text{HE}_{\text{ges}} 10,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) im 1 L-Maßstab

Über die Ursache für die Verschiebung der Säureproduktion kann nur spekuliert werden. Sie könnte auf einzelnen oder dem Zusammenspiel mehrerer Faktoren beruhen. Die Phasen niedriger Glycerinkonzentrationen könnten eine Verschiebung des Stoffwechsels verursacht haben. Hierfür spricht die zeitliche Nähe zwischen der Hungerphase und der ansteigenden Milchsäurebildung. Da die Essigsäurebildung nicht beeinträchtigt wurde, ist es ebenfalls denkbar, dass die im Fermentationsmedium angehäuften Verunreinigungen des Rohglycerins die Buttersäurebildung ausgehend vom Acetyl-CoA (siehe Abbildung 2.6) beeinträchtigt haben. Weiterhin könnte die Verdünnung des Mediums durch den hohen Wassergehalt des Rohglycerins zu einer bisher nicht näher spezifizierten Limitierung geführt haben. An dieser Stelle soll daher noch einmal auf den Stamm *Clostridium pasteurianum* verwiesen werden, für den beispielsweise eine Verschiebung von der Butanol- hin zur Milchsäure-Bildung in Folge einer Eisen-Limitierung nachgewiesen wurde [Dabrock et al. 1992]. Es ist ebenfalls

nicht auszuschließen, dass der Wechsel der Lauge von einer Natriumhydroxid- zu einer Ammoniaklösung im Zusammenspiel mit den anderen genannten Faktoren zu der Stoffwechselverschiebung beiträgt.

Das Verhältnis der produzierten Säuren (Essig-, Butter-, Milchsäure) in Korrelation zu 1,3-PD ist in der Größenordnung vergleichbar mit der Pharmaglycerin-Fermentation (siehe Kap. 4.7.4) und liegt im Bereich von ca. 0,3 bis 0,35 mol_{Säuren}·mol_{1,3-PD}⁻¹. In Anbetracht des postulierten Stoffwechselweges (siehe Abbildung 2.6) scheint die Regenerierung der Reduktionsäquivalente durch die Verschiebung hin zur Milchsäurebildung gewährleistet zu werden, da der Weg zur Buttersäure beeinträchtigt ist. Das Verhältnis der Wiedergewinnung von NAD über die 1,3-PD-Bildung und über die Produktion von Butter- und Milchsäure bleibt stöchiometrisch äquivalent zu der der PG-Fermentation.

Im direkten Vergleich wird die durch Anpassung von Medium und Lauge erzielte Optimierung der Fermentation mit vorbehandeltem Rohglycerin K602 deutlich. Zur Vereinfachung wird in Abbildung 4.30 und Tabelle 4.12 nach der jeweiligen Lauge unterschieden.

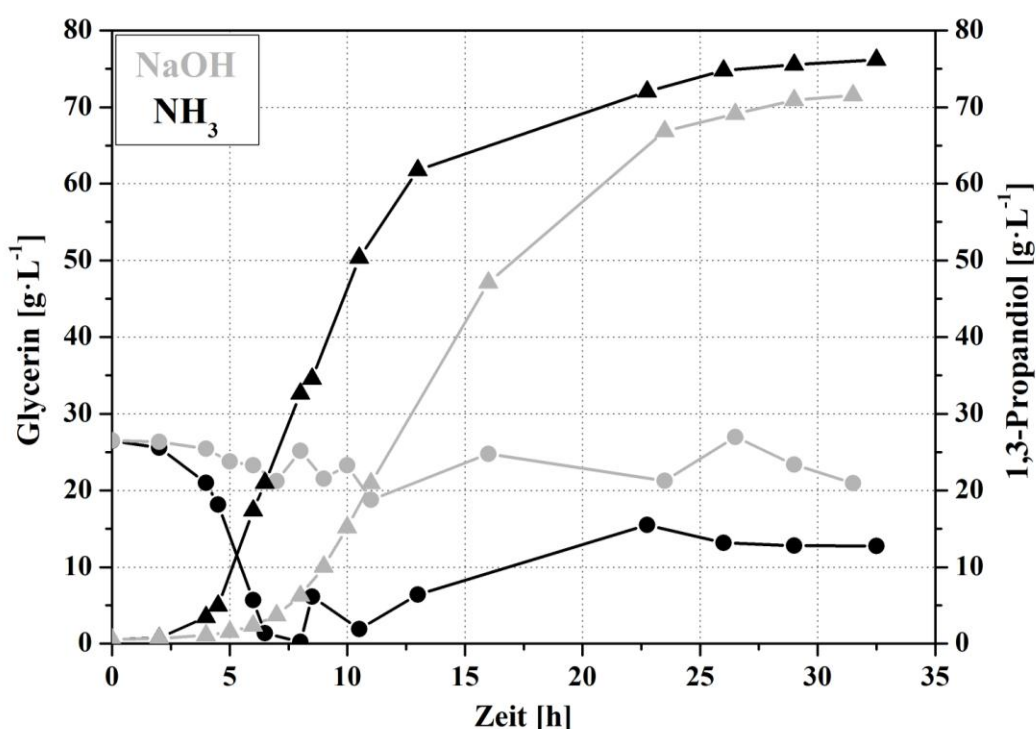


Abbildung 4.30: Glycerin- (Kreis) und 1,3-PD-Konzentration (Dreieck) für Fed-Batch Kultivierungen von AKR 102a mit vorbehandeltem Rohglycerin K602 und Nutzung verschiedener Laugen für die pH-Wert Korrektur

Tabelle 4.12: Ergebnisse der Fed-Batch Kultivierungen von AKR 102a mit vorbehandeltem Rohglycerin K602 und Nutzung verschiedener Laugen für die pH-Wert Korrektur

	NaOH	NH ₃
Zeit [h]	31,5	32,5
1,3-PD _{end} [g _{1,3-PD} · L ⁻¹]	71,5	76,2
Glycerin _{end} [g _{1,3-PD} · L ⁻¹]	20,9	12,5
HE _{ges} [g · L ⁻¹]	12,0	10,5
Q _{ges} [g · L ⁻¹ · h ⁻¹]	2,3	2,3
Q _{max} [g · L ⁻¹ · h ⁻¹]	5,3	7,6
Y [g _{1,3-PD} · g _{Gly} ⁻¹]	0,501	0,514
Y [mol _{1,3-PD} · mol _{Gly} ⁻¹]	0,606	0,622

Durch die Anpassung des Mediums und der Lauge wurde die lag-Phase um mehr als 5 h verkürzt und die maximale Produktivität um über 40 % erhöht. Zusätzlich konnte die 1,3-PD-Konzentration um ca. 5 g · L⁻¹ gesteigert werden. Wie schon zuvor für Pharmaglycerin (siehe Kap. 4.7.4), gehören die mit AKR 102a und Rohglycerin erzielten Fermentationsergebnisse zu den besten bisher publizierten Ergebnissen (siehe Tabelle 2.2). Diese erfolgreiche Prozessoptimierung wurde anschließend in den halbertechnischen 200 L-Maßstab überführt.

4.9.6 Scale-up in den 200 L-Maßstab

In Hinblick auf eine industrielle Anwendung wurde die Umsetzung von Rohglycerin K602 zu 1,3-PD durch den Stamm AKR 102a mit RG_{K602}²⁵HE⁵ in den 200 L-Maßstab übertragen. Da im Rahmen der Hefeextraktreduktion (siehe Kap. 4.8) nachgewiesen wurde, dass mit insgesamt 4 g · L⁻¹ Hefeextrakt über 75 g · L⁻¹ 1,3-PD erreicht werden können, wurde zur Verringerung des materiellen Aufwands auf die Hefeextraktnachführung verzichtet. Weiterhin erfolgte der Einsatz unsterilen, unverdünnten Rohglycerins als Feed zur Minimierung des experimentellen Aufwandes. Die Vorbehandlung des Rohglycerins beschränkte sich zusätzlich auf die weitestgehende Entfernung der Schwimmschicht. Aus apparativen Gründen (Materialbeständigkeit) wurde die Konzentration der Lauge (NH₃) auf eine 10 %ige Lösung reduziert. Die erhaltenen Fermentationsergebnisse finden sich in den Abbildung 4.31 und Abbildung 4.32

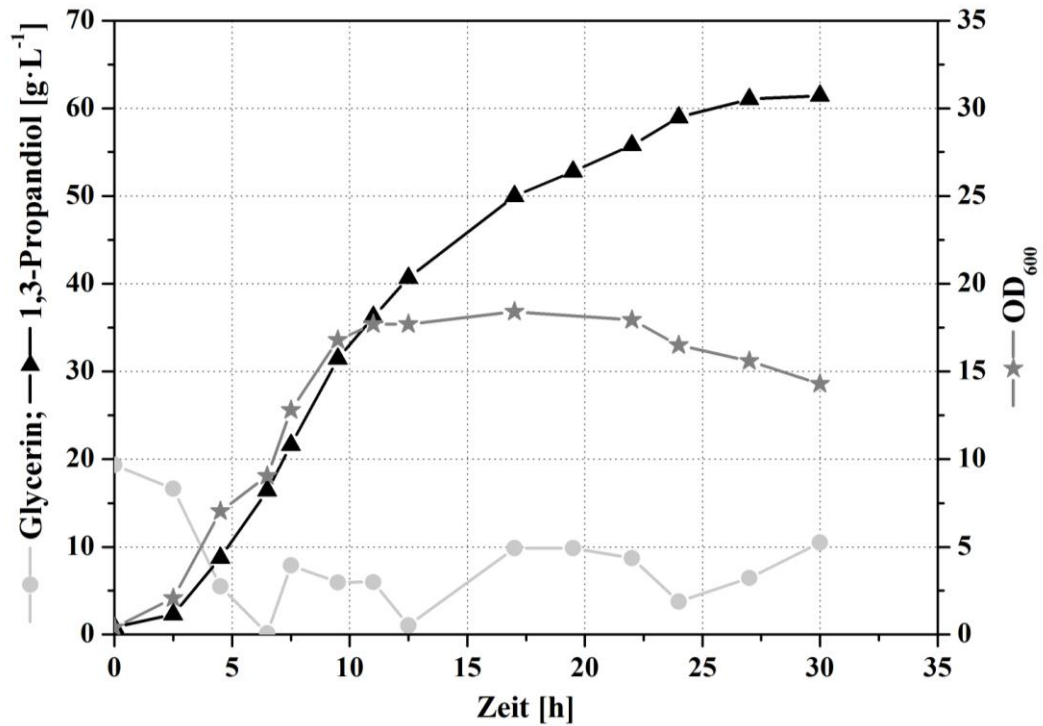


Abbildung 4.31: Fed-Batch Kultivierung von AKR 102a mit vorbehandeltem Rohglycerin K602 (Schwimmschichtabtrennung) und Hefeextrakt (HE_{ges} 3,5 g·L⁻¹) im 200 L-Maßstab

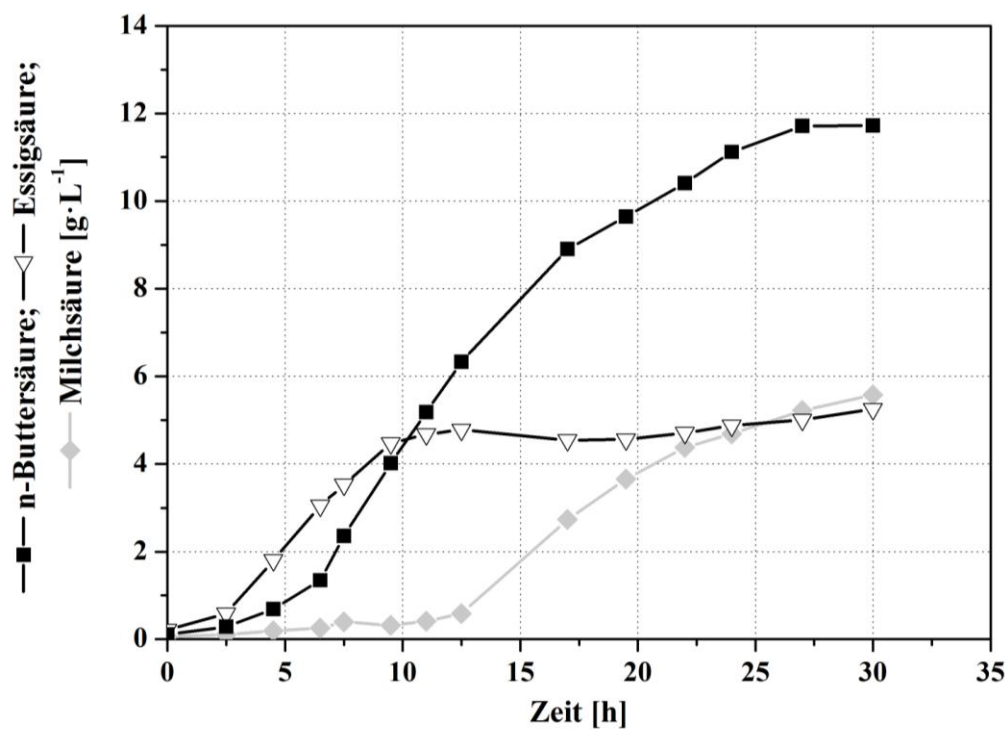


Abbildung 4.32: Nebenprodukte der Fed-Batch Kultivierung von AKR 102a mit vorbehandeltem Rohglycerin K602 (Schwimmschichtabtrennung) und Hefeextrakt (HE_{ges} 3,5 g·L⁻¹) im 200 L-Maßstab

Die zu Versuchsbeginn vorliegende Glycerinkonzentration betrug $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Da der verwendete Fermenter nicht über ein System zur HPLC-Onlinebestimmung der Edukt- bzw. Produktkonzentrationen verfügte, wurden Proben der Fermenterbrühe offline vermessen. Anschließend wurde die Feeddosage entsprechend dem Prozessverlauf manuell angepasst. Die maximale Produktivität lag zwischen 6 und 9 Stunden nach Fermentationsstart bei $5,0 \text{ g}_{1,3\text{-PD}}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. Die finale 1,3-PD-Konzentration von $61,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ wurde bei einer verbleibenden Glycerinkonzentration von $10,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ nach 30 h erreicht. Die Gesamtproduktivität lässt sich folglich auf $2,1 \text{ g}_{1,3\text{-PD}}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ berechnen. Die Ausbeuten von $0,530 \text{ g}_{1,3\text{-PD}}\cdot\text{g}_{\text{Gly}}^{-1}$ respektive $0,641 \text{ mol}_{1,3\text{-PD}}\cdot\text{mol}_{\text{Gly}}^{-1}$ bewegen sich in einer zur Fermentation im kleineren Maßstab vergleichbaren Größenordnung (siehe Kap. 4.9.5). Der Verlauf der Säureproduktion und die Endkonzentrationen entsprechen mit $11,7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Buttersäure, $5,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Essigsäure und $5,6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Milchsäure ebenfalls etwa der 1 L Fermentation mit vorbehandeltem Rohglycerin K602. Der Anstieg der Milchsäurekonzentration lässt sich hierbei vermutlich erneut mit der Hungerphase in Verbindung setzten. Die verhältnismäßig niedrige 1,3-PD-Konzentration könnte sich auf mehrere Ursachen zurückführen lassen. Der auf das Endvolumen bezogene Einsatz von Hefeextrakt belief sich nur auf ca. $3,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ und liegt damit bei ca. $\frac{1}{3}$ im Vergleich zu den ca. $10,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ des 1 L-Maßstabs (siehe Abbildung 4.33). Weiterhin führte die technisch bedingte Verdünnung der Lauge (10 %ige gegenüber 25 %iger Lösung) zu einer Erhöhung des Wassereintrages.

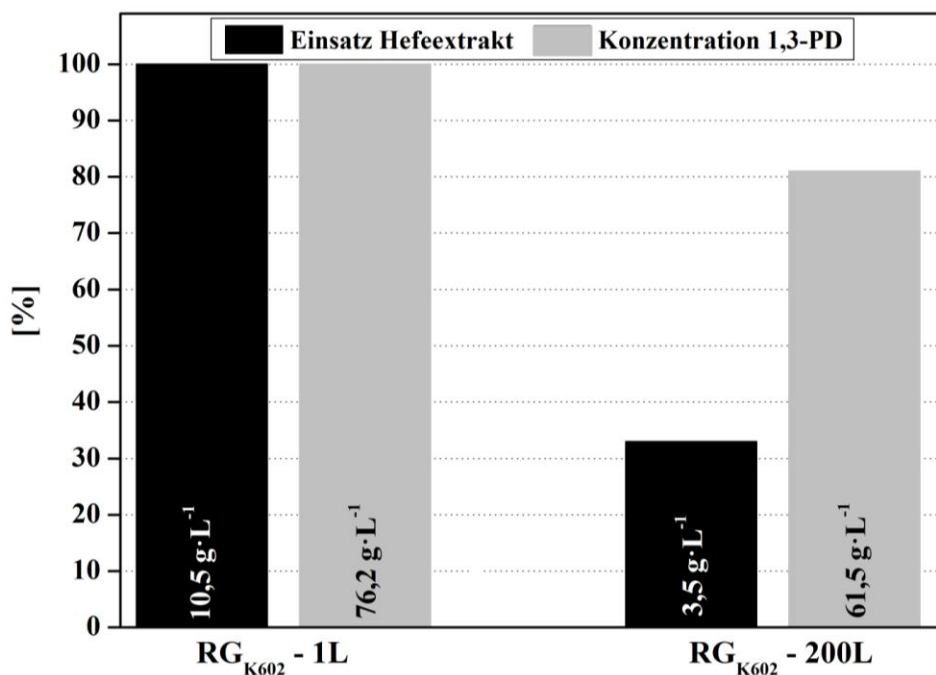


Abbildung 4.33: Prozentualer Vergleich von Gesamtheefeextrakteinsatz und erreichter 1,3-PD Konzentration für die RG-Fermentationen von AKR 102a im 1 bzw. 200 L-Maßstab

Es konnte gezeigt werden, dass trotz deutlicher Vereinfachung der Prozessführung eine erfolgreiche Maßstabsvergrößerung in den 200 L-Maßstab vorgenommen werden kann. Der verringerte apparative Aufwand (kein HPLC-Onlinemesssystem oder zusätzlicher Sauerstofffilter), große Energieeinsparungen (unsteriler Feed), geringere Medienkosten (Reduzierung Hefeextrakteinsatz von 10,5 auf 3,5 g·L⁻¹) sowie die vereinfachte Rohglycerin-Vorbehandlung (ohne Hydrotalcit) führen zu einer deutlichen Reduktion der Prozesskosten. Es ist weiterhin denkbar den Stickstoffgehalt des Mineralsalzmediums zu reduzieren, da über die Lauge (NH₃) eine konstante Versorgung gewährleistet ist. Kombiniert mit einer weiterführenden Optimierung der Prozessführung, z. B. durch eine automatisierte Fütterung, zur Erhöhung der Produktkonzentration und Produktivität, ist eine ökonomische biotechnologische Produktion von 1,3-Propandiol aus Rohglycerin erfolgreich durchführbar.

4.10 Hefeextraktersatzstoffe (AKR 102a)

Nach dem Glycerin stellt Hefeextrakt den nächst höheren Kostenanteil des Fermentationsmediums dar. Zur Senkung der Prozesskosten ist daher neben einer Reduktion (siehe Kap. 4.8) auch eine teilweise oder komplette Substitution mit alternativen preiswerteren Substanzen denkbar.

4.10.1 Ersatz durch definierte Komponenten

Eine Möglichkeit zur Substitution von Hefeextrakt stellt der Einsatz spezifischer definierter Komponenten dar. In Betracht kommen hierbei z. B. Vitamine, Aminosäuren und alternative Stickstoffquellen.

4.10.1.1 96-Well-Mikrotitermaßstab

Im Rahmen der Stammauswahl wurde bereits gezeigt, dass AKR 102a grundsätzlich in der Lage ist auf einem vitaminhaltigen Mineralsalzmedium ohne Hefeextrakt zu wachsen (siehe Kap. 4.6). Im 96-Well-Mikrotitermaßstab wurde das Wachstumsverhalten mit einer Vitamin- (VL) oder Aminosäurelösung (AS) bzw. einer Kombination beider überprüft. Die Zusammensetzung der Aminosäurelösung (siehe Tabelle 3.5) wurde dabei so gewählt, dass die 2 g·L⁻¹ Hefeextrakt des verwendeten Mediums (PG²⁵_{vial}) durch 2 mL·L⁻¹ dieser Lösung substituiert werden können. Von der Vitaminlösung wurden ebenfalls 2 mL·L⁻¹ eingesetzt. Die Zugabe beider anaerobisierter Lösungen erfolgte steriltfiltriert. Der Verlauf der optischen Dichte

findet sich in Abbildung 4.34. Als Negativkontrolle diente das Wachstum auf Mineralsalzmedium ohne weiteren Zusatz.

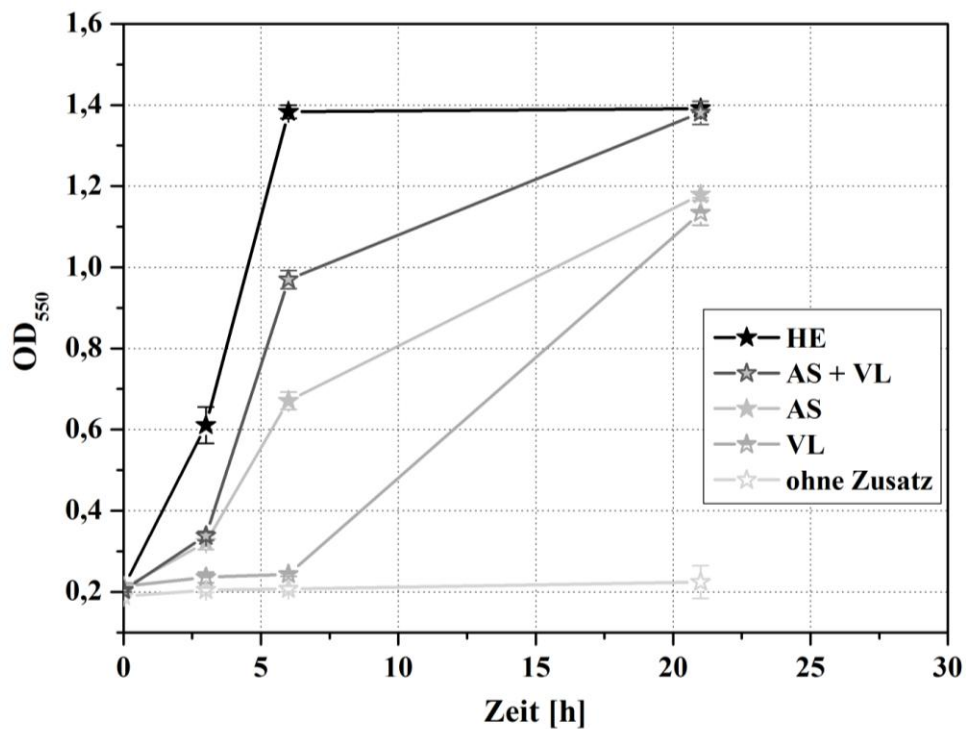


Abbildung 4.34: Wachstum von AKR 102 auf PG²⁵_{Vial} mit Hefeextrakt, Vitaminlösung (VL) oder Aminosäurelösung (AS) im 96-Well-Mikrotitermaßstab

Der Versuch bestätigt die Fähigkeit des Stammes AKR 102a auf einem vitaminhaltigen Mineralsalzmedium ohne Hefeextrakt wachsen zu können. Jedoch wird dies durch eine verhältnismäßig lange lag-Phase von mehr als 6 h begleitet. Durch den alleinigen Zusatz freier Aminosäuren konnte bereits ein deutlich schnelleres Wachstum erreicht werden. Eine Kombination beider Lösungen erzielte unter den gewählten Versuchsbedingungen ähnliche Resultate wie die Referenz mit Hefeextrakt.

4.10.1.2 Fed-Batch Fermentation

Die Erkenntnisse des Versuchs im Mikrotitermaßstab wurden auf eine Fed-Batch Fermentation mit Pharmaglycerin (PG²⁵, 1 L-Maßstab) übertragen. Im Fokus stand dabei die Frage, wie effektiv der Hefeextrakt durch definierte Substanzen ersetzt werden kann. Hierfür wurden die dem Standardansatz entsprechenden 5 g·L⁻¹ Starthefeextrakt durch Zugabe von sterilfiltrierten 5 mL·L⁻¹ Aminosäurelösung (siehe Tabelle 3.5) und 5 mL·L⁻¹ Vitaminlösung (siehe Tabelle 3.4) ersetzt. Der Gesamtstickstoffgehalt des Hefeextraktes wurde zusätzlich in

Form von Ammoniumsulfat bereitgestellt. Die verwendete Feed-Lösung enthielt neben 80 % (w/v) PG sowohl Vitaminlösung ($40 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$) als auch Ammoniumsulfat ($20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$). Bei der eingesetzten Lauge handelte es sich um 10 M NaOH. Für die Vorkultur der Fermentation wurde PG²⁵_{vial} mit $1 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ Vitaminlösung eingesetzt. Die in Abbildung 4.35 als Vergleich dargestellten Kurven zeigen die 1,3-PD-Bildung der Referenzfermentation mit $11 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Gesamtheefeextrakt sowie der Fermentation mit $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Startheefeextrakt ohne Hefeextrakt-nachführung durch den Feed. Dies entspricht einer auf das Endvolumen bezogenen Gesamtmenge Hefeextrakt von $4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (siehe Kap. 4.8).

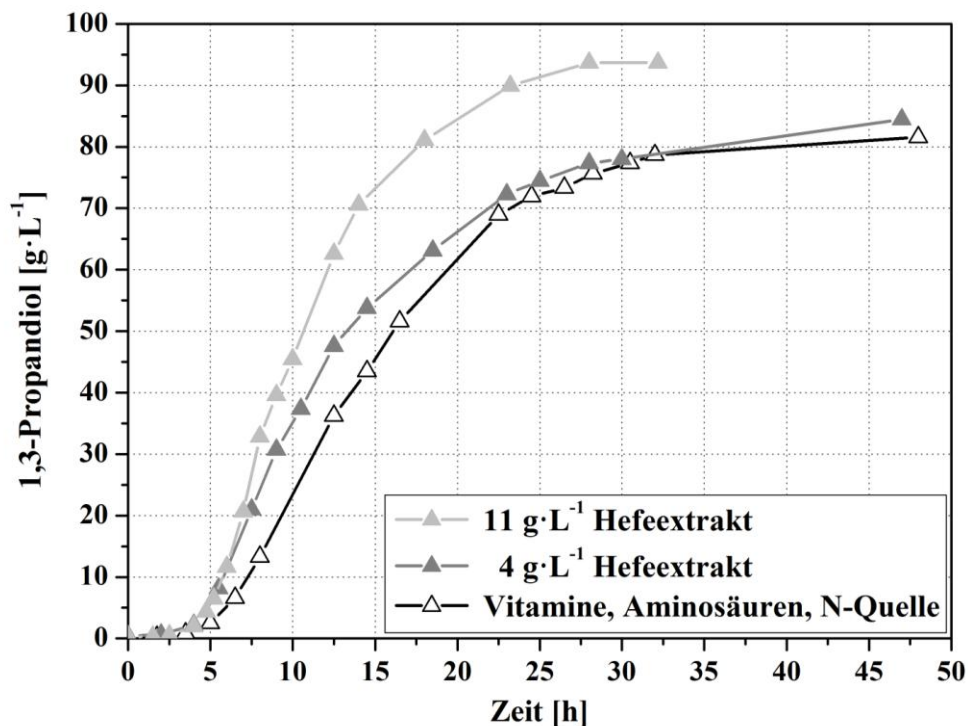


Abbildung 4.35: Verlauf der 1,3-PD-Konzentration bei Fed-Batch Kultivierung von AKR 102 mit PG und Hefeextrakt oder einer Kombination definierter Komponenten

Unter Verwendung der definierten Komponenten konnte eine im Vergleich zum reduzierten Hefeextrakteinsatz ($4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) nahezu identische 1,3-PD-Produktion erzielt werden (siehe Tabelle 4.13). Es zeigt sich ebenfalls, dass der über den Feed deutlich gesteigerte Vitamin- und Stickstoffgehalt gegenüber dem reduzierten Hefeextrakteinsatz keine weitere Erhöhung der Endkonzentration bedingte. Weiterhin ist festzustellen, dass die im Vergleich zu der Fermentation mit $4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ HE geringere Konzentration an Spurenelementen (fehlender Hefeextrakt) unter den gewählten Bedingungen keine negativen Auswirkungen besaß.

Tabelle 4.13: Ergebnisse der Fed-Batch Kultivierungen von AKR 102a mit Pharmaglycerin und Hefeextrakt oder definierten Komponenten

	11 g·L ⁻¹ HE	4 g·L ⁻¹ HE	def. Komp.
Zeit [h]	28	47 (30)	48 (32)
1,3-PD [g·L⁻¹]	93,7	84,5 (78)	81,6 (78,6)
Q [g_{1,3-PD}·L⁻¹·h⁻¹]	3,3	1,8 (2,6)	1,7 (2,5)
Q_{max} [g_{1,3-PD}·L⁻¹·h⁻¹]	8,1	6,5	5,1
Y_{end} [g_{1,3-PD}·g_{Gly}⁻¹]	0,522	0,526	0,526
Y_{end} [mol_{1,3-PD}·mol_{Gly}⁻¹]	0,633	0,636	0,636

Für die Identifizierung der einzelnen essentiellen Komponenten sowie die Bestimmung der tatsächlich notwendigen Konzentrationen sind weiterführende, experimentell aufwändige Untersuchungen (statistische Versuchsplanung) erforderlich. Neben den Aminosäuren und Vitaminen kämen dafür grundsätzlich auch andere Komponenten des Hefeextraktes, wie z. B. Spurenelemente oder Nukleotide in Betracht. Weiterhin müsste analysiert werden, inwiefern der Einsatz dieser potenziell preisintensiven Komponenten ökonomisch realisierbar ist bzw. diese am späteren Einsatzort jederzeit problemlos verfügbar sind. Die Nutzung alternativer preisgünstigerer Vitamin- und Aminosäurequellen stellt daher einen alternativen interessanten Ansatz dar.

4.10.2 Hefeextraktersatz durch komplexe Komponenten

Komplexe, preisgünstige Substanzen aus der Landwirtschaft oder Tierernährung haben großes Potenzial den Hefeextrakt als Bestandteil des Fermentationsmediums zu ersetzen. Sie sind meist in einer gleichbleibenden Qualität erhältlich, unterliegen einer regelmäßigen Kontrolle und können sowohl als Aminosäure-, Vitamin- oder Mineralstoffquelle fungieren.

4.10.2.1 Prozessierte pflanzliche und tierische Materialien

Zur Überprüfung der grundsätzlichen Eignung von Materialien pflanzlichen oder tierischen Ursprunges wurde im 96-Well-Mikrotitermaßstab ein Vergleich des Wachstums von AKR 102a auf PG²⁵_{Vial} mit 2 g·L⁻¹ alternativer kommerziell erhältlicher Präparate für mikrobiologische Fermentationsmedien (Pepton, Fleischextrakt) durchgeführt (siehe Tabelle 3.8). Die Peptone werden dabei durch die enzymatische Hydrolyse proteinreicher Pflanzmaterialien (Soja, Weizen, Kartoffel) oder Casein gewonnen. Der Fleischextrakt entsteht in

Folge der Extraktion von Fleisch durch starkes Erhitzen in Wasser und anschließender Aufkonzentrierung. Als Referenz wurde eine Ansatz mit $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Hefeextrakt verwendet.

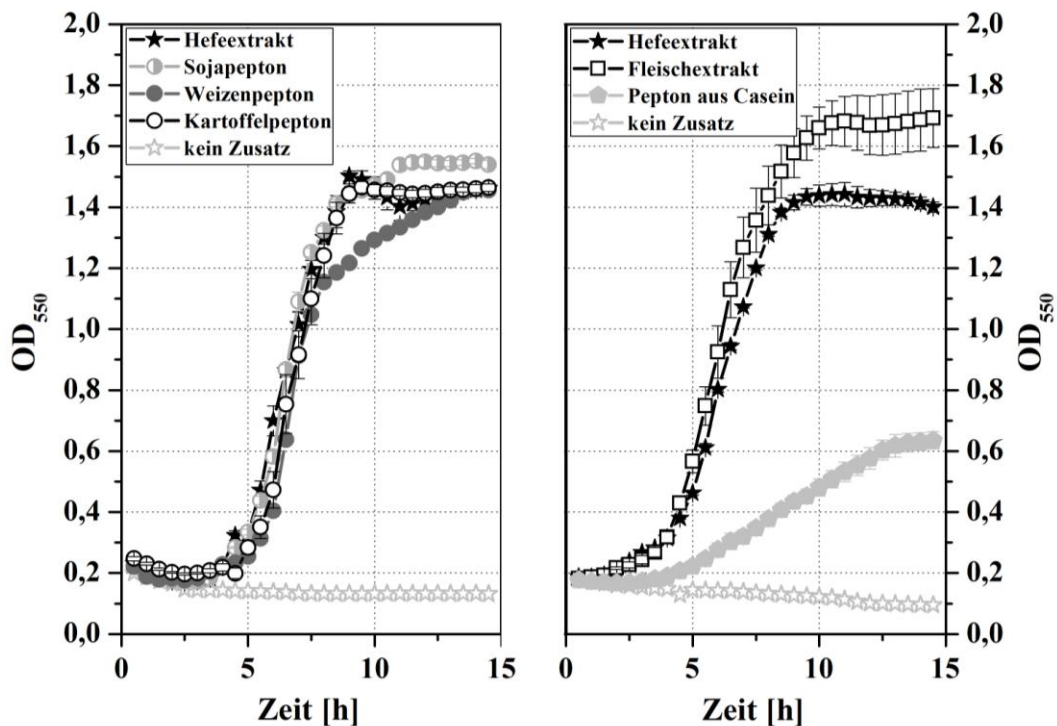


Abbildung 4.36: Verlauf OD_{550} bei Kultivierung von AKR 102a auf PG^{25}_{vial} mit $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Pepton bzw. Fleischextrakt im 96-Well-Mikrotitermaßstab

Der Verlauf der optischen Dichte (siehe Abbildung 4.36) zeigt für die Peptone pflanzlichen Ursprunges ein zu Hefeextrakt vergleichbares Wachstum. Mit Fleischextrakt kann sogar eine leichte Verbesserung erzielt werden. Pepton aus Casein ist in dem eingesetzten Konzentrationsbereich hingegen weniger geeignet, da die erreichte optische Dichte von 0,6 deutlich unter den Maximalwerten der anderen getesteten Substanzen liegt.

Der Versuch zeigt, dass sowohl mit pflanzlichen Peptonen als auch Fleischextrakt der Hefeextrakt grundsätzlich sehr gut ersetzt werden kann. Dies eröffnet die Möglichkeit bei starken Schwankungen des Marktangebotes (Preis, Verfügbarkeit) den Fermentationsprozess auf ein alternatives Co-Substrat umzustellen. Da jedoch durch die Prozessierung des Materials (Hydrolyse, Extraktion) der Preis des Ausgangsrohstoffes zusätzlich erhöht wird, ist der Einsatz aus ökonomischen Gründen im Routinebetrieb nicht erstrebenswert. Im Gegensatz hierzu stellen preisgünstige Neben- oder Abfallprodukte aus der Landwirtschaft oder tierverarbeitenden Industrie eine interessante Alternative dar.

4.10.2.2 Extraktion sowie saure Hydrolyse von Rapspresskuchen

Der bei der Gewinnung von Rapsöl zurückbleibende Rapspresskuchen stellt besonders im Hinblick auf die rapsölbasierte Biodieselproduktion ein interessantes Substrat dar. Beispielhaft wurden daher lösliche Bestandteile durch Autoklavieren extrahiert bzw. der Rapspresskuchen durch saure Hydrolyse aufgeschlossen (siehe Kap. 3.2.7). Die erhaltenen Lösungen wurden mit AKR 102a auf PG^{25}_{Vial} im 96-Well-Mikrotitermaßstab getestet. Hierbei entsprach der Einsatz an Extrakt bzw. Hydrolysat den löslichen Inhaltsstoffen aus 2 g Rapspresskuchen pro Liter Medium. Die in Abbildung 4.37 dargestellten Wachstumsverläufe sind im Vergleich zu der jeweils mitgeführten Positiv- (HE) bzw. Negativreferenz (ohne Zusatz) dargestellt.

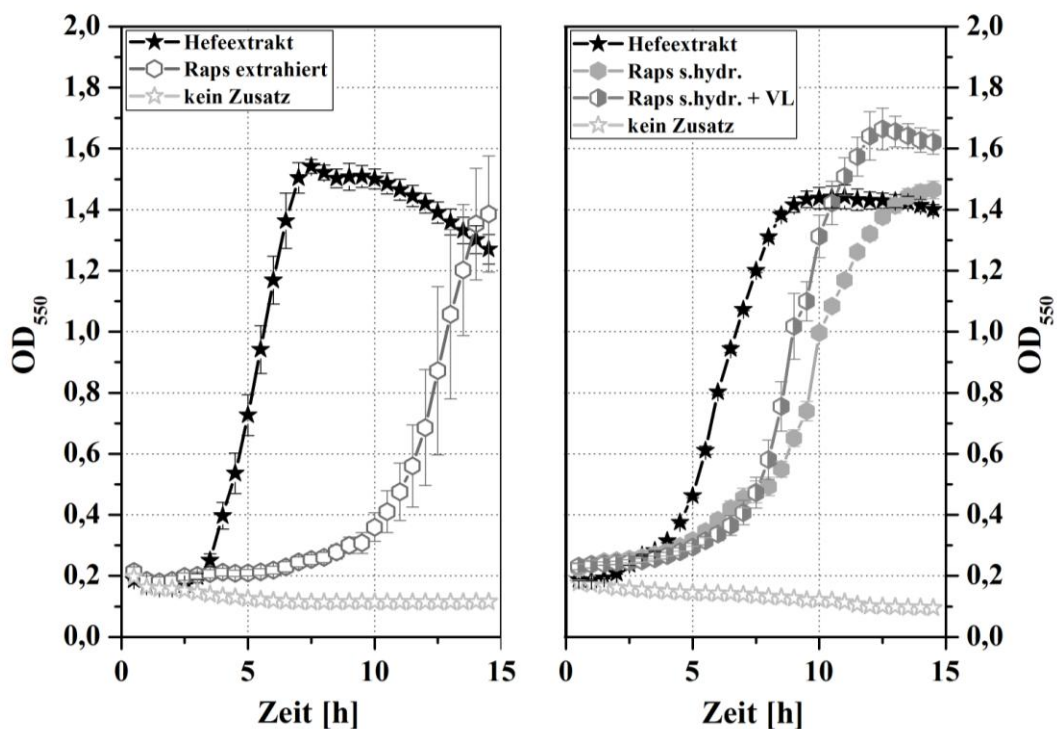


Abbildung 4.37: Verlauf OD_{550} bei Kultivierung von AKR 102a auf PG^{25}_{Vial} mit extrahierten Rapsbestandteilen bzw. sauer hydrolysiertem Rapspresskuchen im 96-Well-Mikrotitermaßstab

Bereits die durch Extraktion gelösten Komponenten (Raps extrahiert) ermöglichen ein deutliches Wachstum im Vergleich zur Negativkontrolle. Durch die saure Hydrolyse (Raps s.hydr.) werden die Proteine des Pflanzenmaterials in ihre Aminosäuren aufgespalten, welche den Mikroorganismen somit schneller zur Verfügung stehen. Dies bewirkte eine deutliche Beschleunigung des Wachstums. Durch die zusätzliche Zugabe von $2 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ Vitaminlösung (Raps s.hydr. + VL) konnte die Wachstumsgeschwindigkeit weiter gesteigert werden. Jedoch

resultieren sowohl der Aufschluss als auch die Vitaminzugabe in einem zusätzlichen Energie-, Zeit- und Materialaufwand.

4.10.2.3 Verwertbarkeit von HE-Ersatzstoffen im 96-Well-Mikrotitermaßstab

Der für Rapspresskuchen durchgeführte Aufschluss und die Vitaminzugabe sind mit steigenden Kosten gleichzusetzen (Energie, Zeit, Material). Daher sollte ein breiteres Spektrum potenzieller Heefextraktersatzstoffe (siehe Tabelle 3.7) ohne zusätzlichen chemisch/thermischen Aufschluss auf ihre Eignung getestet werden. Zum Einsatz kamen hierbei sowohl Substanzen pflanzlichen (Maisquellwasser, Sojaproteinkonzentrat, Kartoffelprotein) als auch tierischen Ursprungs (Fischmehl, Griebenmehl, Fleischknochenmehl). Weiterhin sind mit Glutamin (Biomasse aus der Glutaminsäureproduktion) bzw. Protigrain® (hefehaltige getrocknete Schlempe der getreidebasierten Bioethanolproduktion) Materialien mikrobiellen Ursprungs getestet worden. Da es sich bei den eingesetzten Substanzen, mit Ausnahme von Maisquellwasser, ausschließlich um reine Feststoffe handelt, wurde im 96-Well-Mikrotitermaßstab mit PG²⁵_{Vial} zunächst nur die Wirkung der löslichen Bestandteile betrachtet um eine Beeinträchtigung der OD-Messung zu verhindern. Die eingesetzte Menge Extrakt (siehe Kap. 3.2.7) entsprach den löslichen Inhaltsstoffen aus 2 g Feststoff pro Liter Medium.

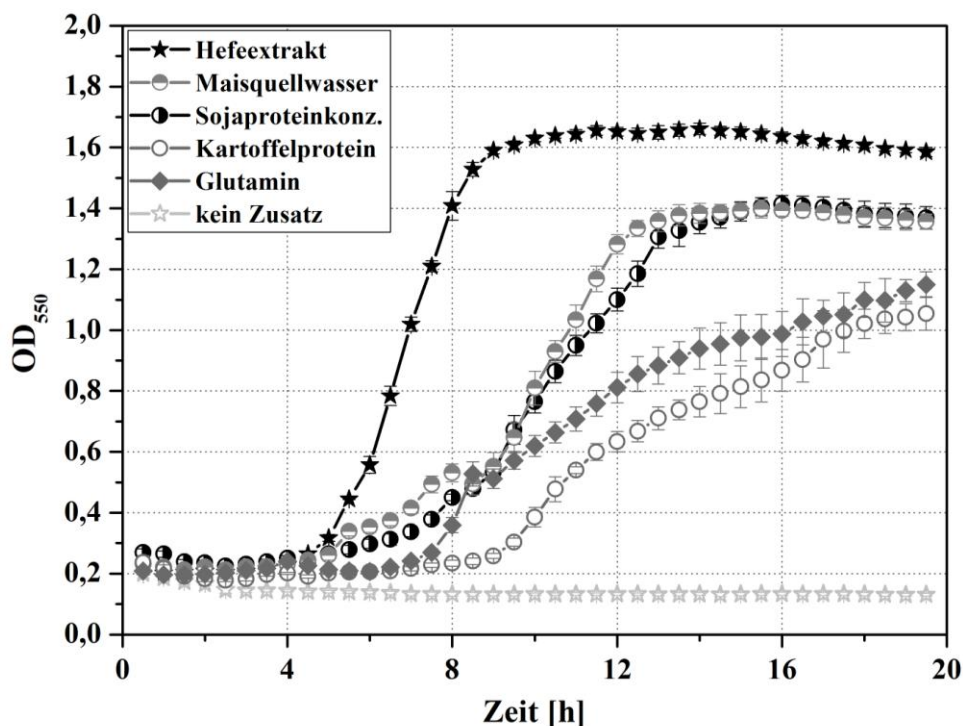


Abbildung 4.38: Verlauf OD₅₅₀ bei Kultivierung von AKR 102a mit PG²⁵_{Vial} und löslichen Bestandteilen der Substanzen pflanzlichen Ursprungs sowie Glutamin im 96-Well-Mikrotitermaßstab

Von den in Abbildung 4.38 dargestellten Hefeextraktersatzstoffen zeigen sowohl Maisquellwasser als auch Sojaproteinkonzentrat mit ca. 4 h die kürzeste lag-Phase und ein zueinander nahezu identisches Wachstum. Im Vergleich dazu ist ein Wachstum für die Ansätze mit Kartoffelprotein und Glutamin erst nach ca. 8 h Stunden festzustellen. Bei den Einsatzstoffen tierischen Ursprungs bzw. Protigrain® (siehe Abbildung 4.39) ist das deutlich beste Wachstum durch die Verwendung von Fischmehl zu verzeichnen.

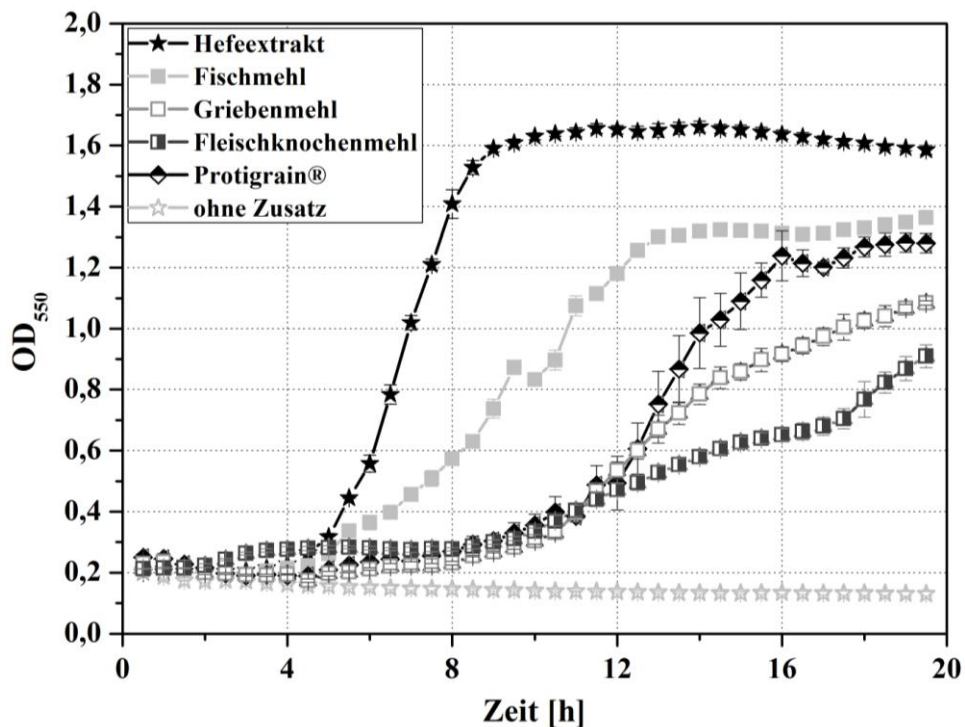


Abbildung 4.39: Verlauf OD_{550} bei Kultivierung von AKR 102a mit PG^{25}_{Vial} und löslichen Bestandteilen der Substanzen tierischen Ursprungs sowie Protigrain® im 96-Well-Mikrotitermaßstab

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass bereits der Einsatz der extrahierten Komponenten für alle getesteten Substanzen eine wachstumsfördernde Wirkung zeigte. Dieser Vorversuch lieferte erste Hinweise darüber wie hoch das Potenzial der getesteten Substanzen ist als Hefeextraktersatz fungieren zu können. Im Folgenden wurden die Materialien im Vialmaßstab weiter untersucht.

4.10.2.4 Verwertbarkeit von HE-Ersatzstoffen im 50 mL-Vialmaßstab

In Ergänzung zu den zuvor erhaltenen Ergebnissen wurde getestet, ob sich durch die Bereitstellung der zunächst unlöslichen Feststoffpartikel eine Änderung in der Eignung der ausgewählten Substanzen ergibt. Hierfür erfolgte die Umsetzung im 50 mL-Vial auf PG^{25}_{Vial}

mit je $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Ersatzstoff. Als Referenz diente ein Ansatz mit $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Hefeextrakt. Im Vialmaßstab wurde erstmalig Weizenkleber getestet. Dies ist die Folge der Quelleigenschaften des Weizenklebers, durch die sich kein geeigneter Extrakt für den Versuch im 96-Well-Mikrotitermaßstab herstellen ließ. Experimentell bedingt wurde für einen Teil der Versuche eine Vorkultur mit $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (siehe Abbildung 4.40) oder $0,1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Hefeextrakt (siehe Abbildung 4.41) verwendet.

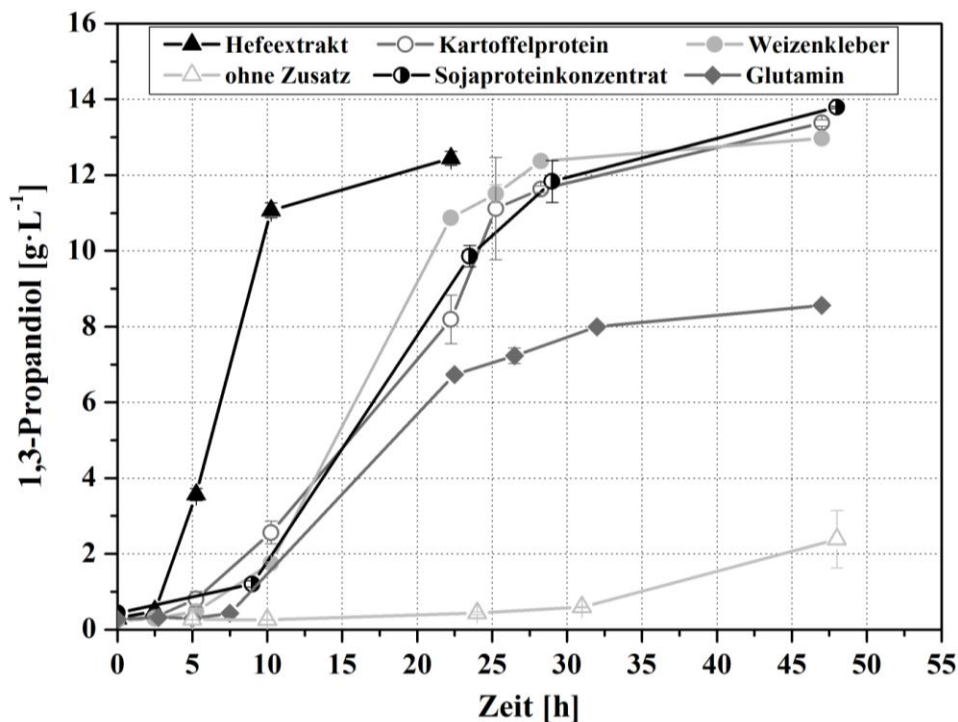


Abbildung 4.40: 1,3-PD Konzentration bei Kultivierung von AKR 102a mit $\text{PG}^{25}_{\text{vial}}$ und $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ verschiedener pflanzlicher Hefeextraktersatzstoffe sowie Glutamin

Der Einsatz der drei getesteten pflanzlichen Substanzen (Kartoffelprotein, Sojaproteinkonzentrat, Weizenkleber) führt zu nahezu identischen Konzentrationsverläufen für 1,3-PD. Die im Vergleich zum vorherigen Versuch (siehe Abbildung 4.38) auftretende Ergebnisverbesserung für Kartoffelprotein kann für Glutamin nicht beobachtet werden. Die geringe 1,3-PD-Bildung für den Ansatz ohne Zusatz ist auf die Verschleppung von Hefeextraktresten aus der Vorkultur zurückzuführen.

Die erhaltenen 1,3-PD-Verläufe der tierischen Komponenten (Fisch-, Fleischknochen-, Griebenmehl) und Protigrain® bestätigen die Ergebnisse aus dem 96-Well-Mikrotitermaßstab (siehe Abbildung 4.39). Im direkten Vergleich ist die mit Fischmehl erzielte lag-Phase dabei ca. 15 h kürzer als die der anderen Substanzen.

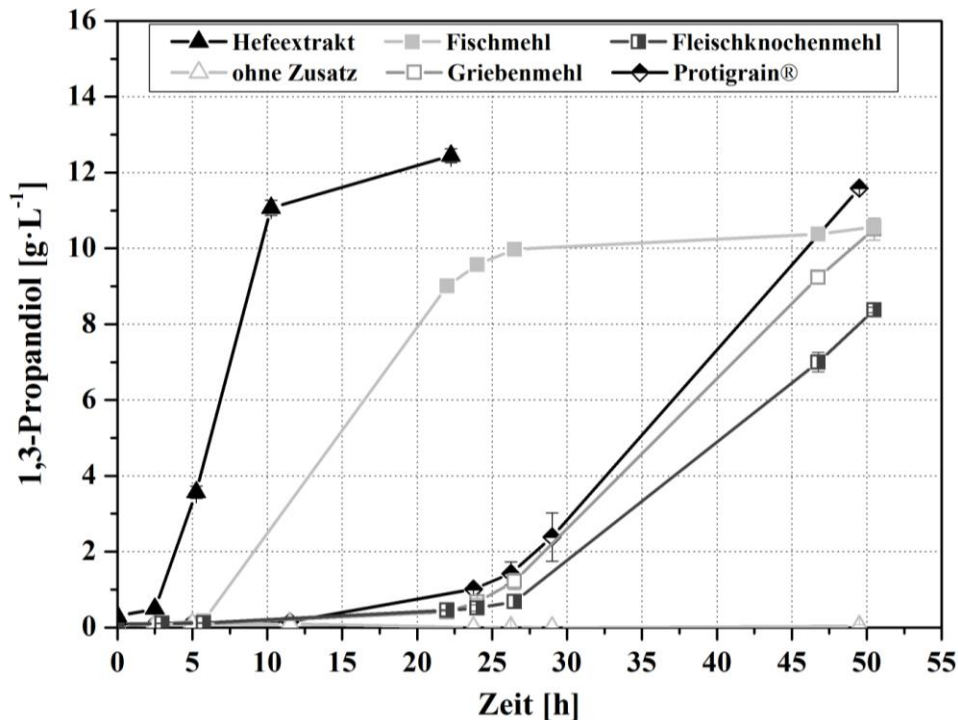


Abbildung 4.41: 1,3-PD Konzentration bei Kultivierung von AKR 102a mit $\text{PG}^{25}_{\text{vial}}$ und $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ verschiedener tierischer Hefeextraktersatzstoffe sowie Protigrain®

Auf Grund der in den Vorversuchen erhalten Ergebnisse wurden als vielversprechendste Hefeextraktersatzstoffe Fischmehl, Sojaproteinkonzentrat, Weizenkleber, Kartoffelprotein und Maisquellwasser für eine weitere Evaluation im Rahmen von 0,5 L-Batch Fermentationen ausgewählt.

4.10.2.5 Voruntersuchung für die 0,5 L-Batch Fermentationen

Nach den Vorversuchen im 96-Well-Mikrotiter- und Vialmaßstab wurden die ausgewählten Hefeextraktersatzstoffe in pH-geregelten 0,5 L-Batch Fermentationen weiterführend untersucht (siehe Kap. 3.6.4). Dieser Ansatz wurde als Zwischenstufe zwischen dem Vialmaßstab und den technisch aufwändigeren Fed-Batch Fermentationen verwendet, um den Einfluss einer längeren Kultivierung und höheren Substrat- bzw. Produktkonzentration zu testen. Um zu bestimmen, welche maximale Glycerinkonzentration eingesetzt werden kann, wurden drei vergleichende Fermentationen mit jeweils ca. 100, 125 bzw. $150 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Pharmaglycerin ($\text{PG}^{\text{XHE}5}$) durchgeführt. Ziel war das Erreichen einer höchstmöglichen 1,3-PD-Konzentration in einem angemessenen Versuchszeitraum. Der Versuch zur Hefeextraktreduktion (siehe Kap. 4.8) hatte bereits gezeigt, dass mit $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Hefeextrakt für die oben genannten Glycerinkonzentrationen ein Vollumsatz erzielt werden kann. Um eine möglichst schnelle

Glycerinumsetzung zu erreichen, wurde jedoch eine Startkonzentration von $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Hefeextrakt gewählt. Die Verläufe der Substrat- und Produktkonzentrationen finden sich in Abbildung 4.42

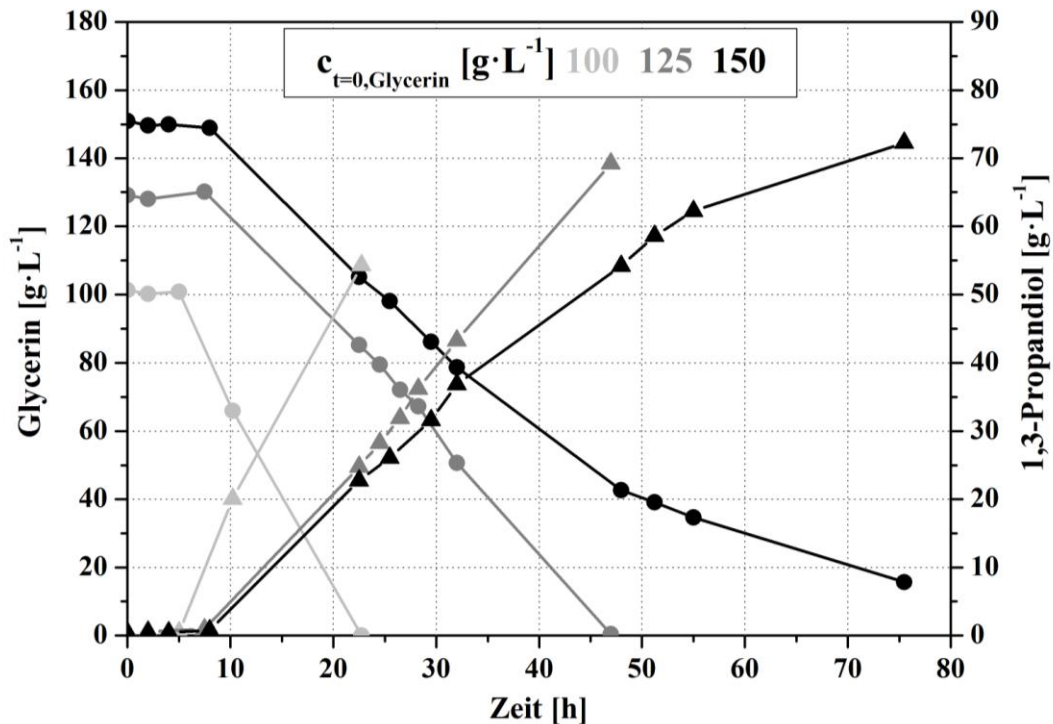


Abbildung 4.42: Glycerin- (Kreis) und 1,3-PD-Konzentrationen (Dreieck) für Batch Fermentationen von AKR 102a mit Pharmaglycerin und $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Hefeextrakt

Bei einer Startkonzentration von $100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ wird in weniger als einem Tag der Vollumsatz des Glycerins erreicht. In Folge der wachstumshemmenden Wirkung steigender Glycerinkonzentrationen (siehe Kap. 4.7.2) führte eine Erhöhung auf $125 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ sowohl zu einer Verlängerung der lag-Phase als auch einer Verringerung der 1,3-PD-Bildungsgeschwindigkeit. Nach 2 Tagen ist dennoch das vorgelegte Glycerin vollständig umgesetzt. Eine weitere Erhöhung des Glyceringehaltes resultierte im Beobachtungszeitraum bei nur marginal gesteigener Produktkonzentration in einer weiteren Verringerung der 1,3-PD-Bildungsgeschwindigkeit (siehe Tabelle 4.14).

Tabelle 4.14: Ergebnisse der Batch Fermentationen von AKR 102a mit verschiedenen Pharmaglycerinkonzentrationen und 5 g·L⁻¹ Hefeextrakt

	100	125	150
Zeit [h]	23	47	75,5
1,3-PD_{end} [g·L⁻¹]	54,3	69,2	72,3
Glycerin_{end} [g·L⁻¹]	0	0,4	15,7
Q_{ges} [g_{1,3-PD}·L⁻¹·h⁻¹]	2,4	1,5	1,0
Y [g_{1,3-PD}·g_{Gly}⁻¹]	0,531	0,534	0,532
Y [mol_{1,3-PD}·mol_{Gly}⁻¹]	0,643	0,646	0,644

Aus diesen Ergebnissen folgt, dass eine Glycerinkonzentration von 125 g·L⁻¹ die beste Kombination aus angemessener Fermentationsdauer und erzielbarer 1,3-PD-Konzentration darstellt. Eine maximal erreichbare 1,3-PD-Konzentration von ca. 70 g·L⁻¹ liefert eine sehr gute Vergleichsgrundlage für die Verwertbarkeit der zu testenden Hefeextraktersatzstoffe.

4.10.2.6 Verwertbarkeit von HE-Ersatzstoffen in 0,5 L-Batch Fermentationen

Mit ca. 125 g·L⁻¹ Pharmaglycerin (PG¹²⁵) wurde das Produktionspotenzial einiger ausgewählter Ersatzstoffe in 0,5 L-Batch-Fermentationen getestet. Für den direkten Vergleich wurden hierbei je 5 g·L⁻¹ Fischmehl (FM), Sojaproteinkonzentrat (SPK), Maisquellwasser (MQW), Weizenkleber (WK) oder Kartoffelprotein (KP) eingesetzt. Diese Menge wurde gewählt, um die 5 g·L⁻¹ Hefeextrakt der Referenzfermentation (siehe Kap. 4.10.2.5) gravimetrisch identisch zu ersetzen. Größere, mechanisch stabile Partikel (Knorpel, Gräten) des Fischmehls hatten in einem ersten Versuch zum Festsetzen des verwendeten Rührers geführt. In Folge dessen wurde das Fischmehl für alle weiteren Fermentationen gesiebt (Durchmesser ca. 1 mm) eingesetzt. Für alle Ansätze wurde ein Vorkulturmedium mit reduziertem Hefeextraktgehalt verwendet (PG²⁵HE^{0,1}_{vial}). Die Versuchsergebnisse sind in Abbildung 4.43 dargestellt.

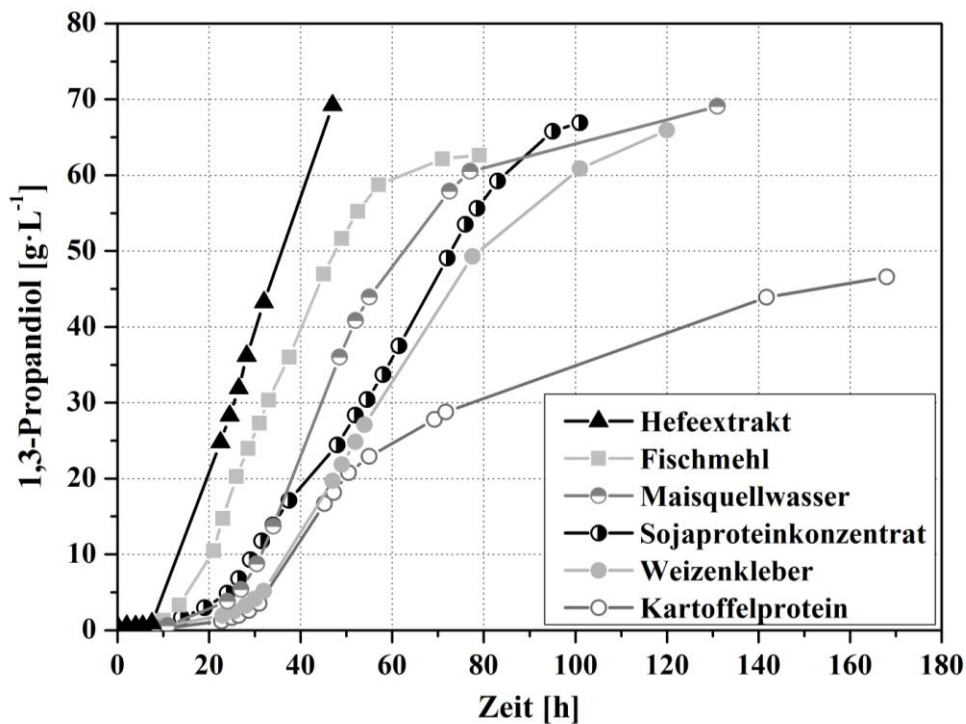


Abbildung 4.43: Batch Fermentationen von AKR 102a mit PG¹²⁵ und 5 g·L⁻¹ Hefeextrakt oder 5 g·L⁻¹ komplexer Ersatzstoffe

Mit Ausnahme von Kartoffelprotein genügten die eingesetzten 5 g·L⁻¹ aller getesteten Hefeextraktersatzstoffe für den annähernden Vollumsatz des vorgelegten Glycerins (siehe Tabelle 4.15). Fischmehl zeichnete sich durch die kürzeste lag-Phase und höchste Produktivität aus. Nach ca. 80 h wurden mit Fischmehl, Maisquellwasser und Sojaproteinkonzentrat vergleichbare 1,3-PD-Konzentrationen um die 60 g·L⁻¹ erzielt. Auffällig ist der kurze Abfall der Produktivität nach ca. 40 h für Sojaprotein. Denkbar ist, dass dies aus dem Verbrauch der gelösten Komponenten resultierte. Nach einer ca. 20 stündigen lag-Phase wurde mit Weizenkleber eine zu den anderen Ersatzstoffen vergleichbare Produktbildung erreicht. Für Kartoffelprotein konnte bis ca. 50 h ein zu Weizenkleber parallel verlaufender Anstieg der 1,3-PD-Konzentrationen beobachtet werden. Im weiteren Verlauf kam es jedoch zu einem sehr deutlichen Abfall der Produktivität. Diese Fermentation wurde daher nach einer Laufzeit von einer Woche abgebrochen.

Tabelle 4.15: Ergebnisse der Batch Fermentationen von AKR 102a mit PG und 5 g·L⁻¹ HE oder 5 g·L⁻¹ komplexer Ersatzstoffe zum Zeitpunkt des Fermentationsabbruches

	HE	FM	SPK	MQW	WK	KP
Zeit [h]	47	79	101	131	120	168
1,3-PD_{end} [g·L⁻¹]	69,2	62,6	66,9	69,1	65,9	46,9
Glycerin_{end} [g·L⁻¹]	0,4	6,9	2,1	0,4	3,8	42,6
Q_{ges} [g_{1,3-PD}·L⁻¹·h⁻¹]	1,5	0,8	0,7	0,5	0,6	0,3
Q_{max} [g_{1,3-PD}·L⁻¹·h⁻¹]	1,5	1,5	1,1	1,5	1,1	0,9
Y [g_{1,3-PD}·g_{Gly}⁻¹]	0,534	0,519	0,529	0,538	0,533	0,542
Y [mol_{1,3-PD}·mol_{Gly}⁻¹]	0,646	0,628	0,640	0,652	0,645	0,655

Kartoffelprotein wurde in Folge des langsamen Wachstums und der geringen im Beobachtungszeitraum erreichten 1,3-PD-Konzentration von 46,9 g·L⁻¹ für weiterführende Versuche nicht berücksichtigt. Der eingesetzte Weizenkleber bildete nach dem Autoklavieren des Fermentationsmediums große Aggregate. Dies machte ihn für Fed-Batch Fermentationen in dem verwendeten System ungeeignet, da die Gefahr eines Verstopfens der Pumpenschläuche bestand. Fischmehl führte auf Grund seiner materiellen Beschaffenheit trotz Siebung zu wiederholten Beeinträchtigungen der Rührvorrichtung. Dennoch spricht die erreichte höchste 1,3-PD-Produktivität von 1,5 g_{1,3-PD}·L⁻¹·h⁻¹ für das Potenzial dieser Substanz. Weiterhin zeigten Maisquellwasser und Sojaproteinkonzentrat ebenfalls gute 1,3-PD-Bildungsraten. Von den getesteten Substanzen wurden somit Fischmehl, Sojaproteinkonzentrat und Maisquellwasser als aussichtsreichste Hefeextraktersatzstoffe für weiterführende Fed-Batch Fermentationen ausgewählt.

4.10.2.7 Fed-Batch Fermentationen mit HE-Ersatzstoffen im 1 L-Maßstab

Fischmehl (FM)

Fischmehl wurde in zwei Konzentrationen in Fed-Batch Fermentationen mit Pharmaglycerin (PG²⁵) getestet. Hierbei wurden Startkonzentrationen von 5 bzw. 10 g·L⁻¹ Fischmehl eingesetzt. Die Feedlösung enthielt 80 % (w/v) Pharmaglycerin und 20 g·L⁻¹ Fischmehl. Als Lauge kam analog zu den Pharmaglycerinfermentationen mit Hefeextrakt (siehe Kap. 4.7.4) 10 M NaOH zum Einsatz. Auf das Endvolumen bezogen, wurden somit ca. 7 bzw. 11,5 g·L⁻¹ Fischmehl verwendet. Die Gesamtmenge Fischmehl wurde im Vergleich zur Batch Fermentation erhöht um höhere 1,3-PD-Konzentrationen zu erreichen. Die Konzentration von 11,5 g·L⁻¹ Fischmehl ist damit vergleichbar mit dem Gesamtheefeextrakteinsatz der

Referenzfermentation (siehe Kap. 4.7.4). Die erhaltenen Ergebnisse sind im Vergleich zur Batch Fermentation in Abbildung 4.44 dargestellt.

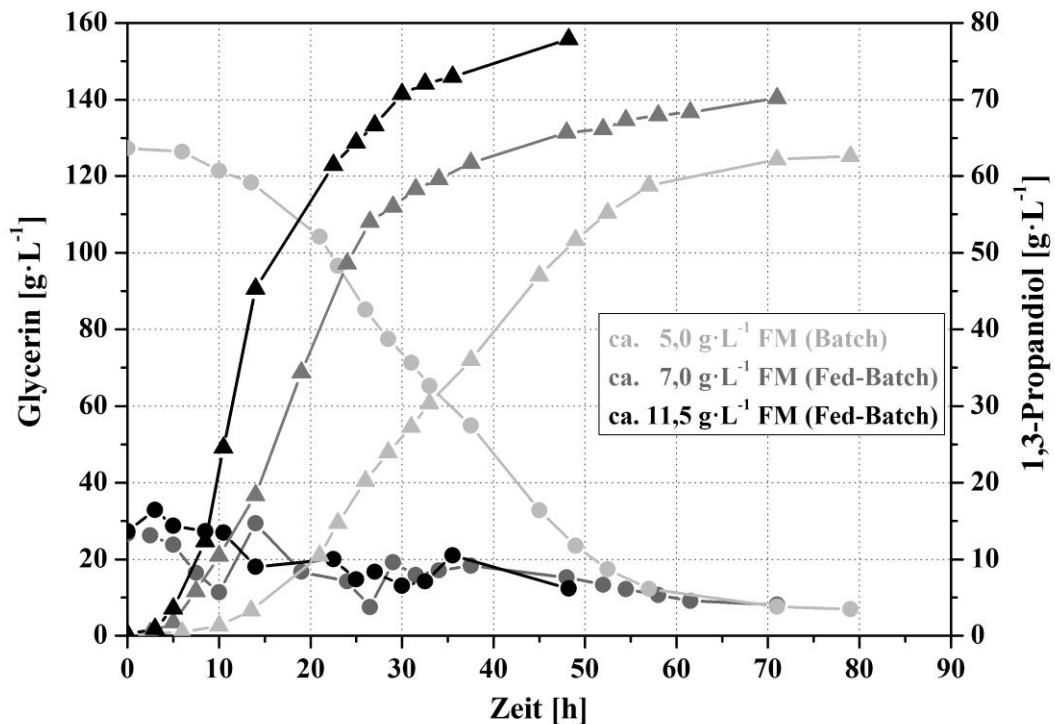


Abbildung 4.44: Glycerin- (Kreis) und 1,3-PD-Konzentrationen (Dreieck) für Batch bzw. Fed-Batch Fermentationen von AKR 102a mit Pharmaglycerin und Fischmehl

Der Wechsel von $125 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (Batch) auf $25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (Fed-Batch) Startglycerin bewirkte bei einer gleichbleibenden Startkonzentration an Fischmehl ($5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) eine deutliche Verkürzung der lag-Phase um etwa 5 h. Dies ist auf die verringerte wachstumshemmende Wirkung niedriger Glycerinkonzentrationen (siehe Kap. 4.7.2) zurückzuführen. Durch die Kombination aus niedriger Glycerinkonzentration und leichter Erhöhung der gesamten Fischmehlmenge von $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (Batch) auf $7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (Fed-Batch) wurde die maximale Produktivität im Vergleich zur Batch-Fermentation mehr als verdoppelt (siehe Tabelle 4.16). Durch eine deutliche Erhöhung der vorgelegten Fischmehlkonzentration im Fed-Batch von 5 auf $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ wurde die maximale Produktivität noch einmal verdoppelt. Es wird deutlich, dass durch die höhere Bereitstellung des Hefeextraktersatzstoffes eine Erhöhung sowohl der Produktivität als auch der im Beobachtungszeitraum erzielten 1,3-PD-Konzentration ermöglicht wird.

Tabelle 4.16: Ergebnisse der Batch bzw. Fed-Batch Fermentationen von AKR 102a mit Pharmaglycerin und Fischmehl (Gesamteinsatz)

Fischmehl _{ges}	Batch	Fed-Batch	
	5 g·L ⁻¹	7 g·L ⁻¹	11,5 g·L ⁻¹
Zeit [h]	79	71	48
1,3-PD _{end} [g·L ⁻¹]	62,6	70,2	77,9
Glycerin _{end} [g·L ⁻¹]	6,9	8,1	12,3
Q _{ges} [g _{1,3-PD} ·L ⁻¹ ·h ⁻¹]	0,79	1,0	1,6
Q _{max} [g _{1,3-PD} ·L ⁻¹ ·h ⁻¹]	1,5	3,2	6,0
Y [g _{1,3-PD} ·g _{Gly} ⁻¹]	0,519	0,528	0,519
Y [mol _{1,3-PD} ·mol _{Gly} ⁻¹]	0,628	0,639	0,628

Trotz der sehr guten Fermentationsergebnisse ist der industrielle Einsatz von Fischmehl als Hefeextraktersatzstoff fraglich. Fischmehl kann auf Grund seiner materiellen Eigenschaften Probleme bei der Prozessführung verursachen. Zusätzlich stellte es im Rahmen der für Fed-Batch Fermentationen ausgesuchten Ersatzstoffe die teuerste Substanz dar (siehe Anhang Tabelle 6.2). Da vergleichbare 1,3-PD-Konzentrationen mit reduziertem Gesamtheefeextrakteinsatz (2 g·L⁻¹) ebenfalls erreicht werden können (siehe Tabelle 4.5), relativiert sich der Kostenvorteil des niedrigeren Einkaufspreises von Fischmehl durch die höhere erforderliche Einsatzmenge. Bei vergleichbaren 1,3-PD-Konzentrationen und Fermentationsdauern ergeben sich für 2 g·L⁻¹ HE (Ø 6000 € pro Tonne) und für 11,5 g·L⁻¹ Fischmehl (1000 € pro Tonne) jeweils identische Kosten von ca. 1,2 Cent pro Liter Fermentationsbrühe. Der ökonomische Vorteil von Fischmehl gegenüber Hefeextrakt ist somit nicht mehr gegeben.

Sojaproteinkonzentrat (SPK)

Analog zu den Versuchen mit Fischmehl erfolgte die Übertragung der Fermentation mit Sojaproteinkonzentrat und Pharmaglycerin vom Batch (PG¹²⁵) in den Fed-Batch Prozess (PG²⁵). Hierfür wurde eine Startkonzentration von 5 g·L⁻¹ SPK eingesetzt. Die Feedlösung enthielt 80 % (w/v) Pharmaglycerin und 20 g·L⁻¹ Sojaproteinkonzentrat. Als Lauge kam hierbei 10 M NaOH zum Einsatz. Auf das Endvolumen bezogen, wurden ca. 7 g·L⁻¹ Sojaproteinkonzentrat verwendet und somit erneut die Hefeextraktersatzstoffmenge zum Erreichen höherer 1,3-PD-Endkonzentrationen gesteigert. Die erhaltenen Konzentrationsverläufe von 1,3-PD und Glycerin sind im Vergleich zur Batch Fermentation in Abbildung 4.45 dargestellt.

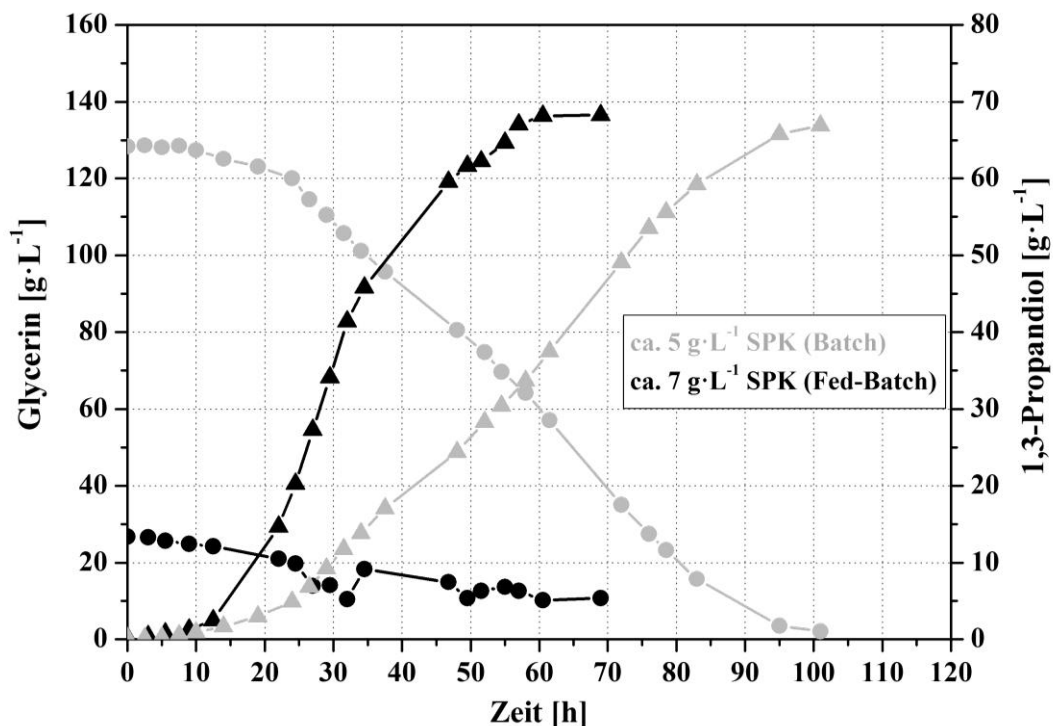


Abbildung 4.45: Glycerin- (Kreis) und 1,3-PD-Konzentrationen (Dreieck) für Batch bzw. Fed-Batch Fermentationen von AKR 102a mit Pharmaglycerin und Sojaproteinkonzentrat

Durch einen Wechsel von Batch auf Fed-Batch bei gleichzeitiger Erhöhung des Gesamteinsatzes an Sojaproteinkonzentrat von $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (Batch) auf $7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (Fed-Batch) wird die maximale Produktivität verdreifacht und die Gesamtproduktivität um 50 % erhöht (siehe Tabelle 4.17). Bei einem um 40 % erhöhten Einsatz an Hefeextraktersatzstoff konnte jedoch keine merkliche Steigerung der 1,3-PD-Endkonzentration erreicht werden.

Tabelle 4.17: Ergebnisse der Batch bzw. Fed-Batch Fermentationen von AKR 102a mit Pharmaglycerin und Sojaproteinkonzentrat (Gesamteinsatz)

	Batch	Fed-Batch
Sojaproteinkonzentrat _{ges}	$5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$	$7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$
Zeit [h]	101	60,5
1,3-PD _{end} [$\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$]	66,9	68,2
Glycerin _{end} [$\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$]	2,1	10,2
Q_{ges} [$\text{g}_{1,3\text{-PD}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$]	0,7	1,1
Q_{max} [$\text{g}_{1,3\text{-PD}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$]	1,1	2,9
Y [$\text{g}_{1,3\text{-PD}} \cdot \text{g}_{\text{Gly}}^{-1}$]	0,529	0,531
Y [$\text{mol}_{1,3\text{-PD}} \cdot \text{mol}_{\text{Gly}}^{-1}$]	0,640	0,643

Da durch eine Erhöhung der Sojaproteinkonzentratmenge keine signifikante Steigerung der 1,3-PD-Konzentration erzielt werden konnte, wurde eine weiterführende Fed-Batch Fermentation (PG²⁵) durchgeführt. Hierbei kam eine Startkonzentration von $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ und eine Gesamtkonzentration von ca. $9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Sojaproteinkonzentrat zum Einsatz. Um einer möglichen Nährstofflimitierung entgegen zu wirken und eine Beschleunigung der 1,3-PD-Bildung zu erreichen, wurde zusätzlich eine kontinuierlich aufrechterhaltene Hefeextraktkonzentration von $0,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ eingesetzt. Bei diesem Ansatz wurde die Gesamtmenge an Sojaproteinkonzentrat bewusst nicht auf $11 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ erhöht um die Materialkosten im Vergleich zu Fischmehl niedrig zu halten (siehe Anhang Tabelle 6.2). Die beiden Fed-Batch Fermentationen mit Sojaproteinkonzentrat sind in Abbildung 4.46 dargestellt.

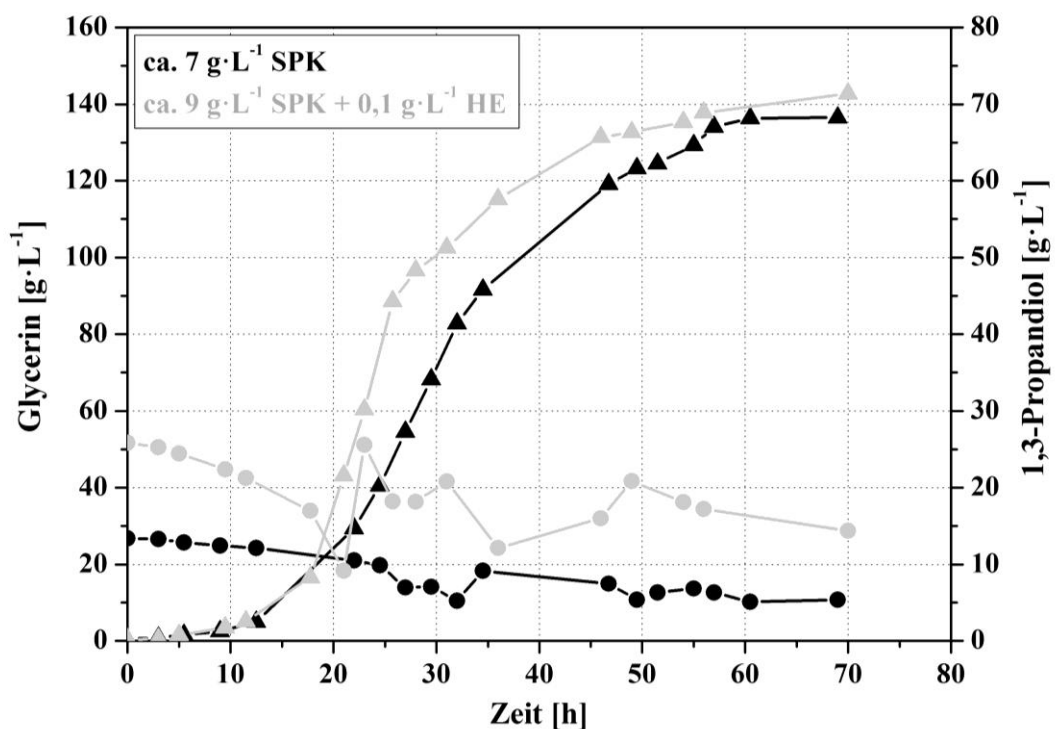


Abbildung 4.46: Glycerin- (Kreis) und 1,3-PD-Konzentrationen (Dreieck) für Fed-Batch Fermentationen von AKR 102a mit Pharmaglycerin und SPK sowie SPK mit Hefeextrakt

Während der ersten 10 h führte die zusätzliche Hefeextraktzugabe zu keiner Beschleunigung der 1,3-PD-Bildung. Im weiterführenden Fermentationsverlauf stieg jedoch die maximale Produktivität deutlich von $2,9$ auf $5,1 \text{ g}_{1,3\text{-PD}}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ an. Im Beobachtungszeitraum konnte durch den erhöhten Materialeinsatz inklusive Hefeextraktzugabe jedoch erneut keine signifikante Steigerung der maximalen 1,3-PD-Konzentration erzielt werden. Es ist denkbar, dass die eingesetzte Hefeextraktmenge zu gering war, um unter den gewählten Versuchs-

bedingungen einen sichtbaren Effekt zu erzielen. Dies gilt einerseits für den Fermentationsbeginn als auch für die 1,3-PD-Endkonzentration. Es ist möglich, dass es zu einer Limitierung eines Medienbestandteils gekommen ist, welche weder durch erhöhte Mengen an Sojaproteinkonzentrat noch die geringe Hefeextraktkonzentration ausgeglichen werden konnte. Weiterhin wäre eine nicht näher bestimmte wachstumsinhibierende Wirkung durch Inhaltsstoffe des verwendeten Sojaproteinkonzentrates, wie z. B. sekundäre Pflanzenstoffe (Flavonoide usw.), denkbar.

Maisquellwasser (MQW)

Als dritter Hefeextraktersatzstoff wurde die Eignung von Maisquellwasser mittels Fed-Batch Fermentation (PG²⁵) überprüft. Hierfür wurde eine Startkonzentration von 10 g·L⁻¹ Maisquellwasser eingesetzt. Die Feedlösung enthielt 80 % (w/v) Pharmaglycerin und 20 g·L⁻¹ Maisquellwasser. Als Lauge kam 10 M NaOH zum Einsatz. Auf das Endvolumen bezogen, wurden ca. 11 g·L⁻¹ Maisquellwasser verwendet, da diese Menge sich auf Grund des sehr niedrigen Einkaufspreises nicht negativ auf die Gesamtprozesskosten auswirkt. Die Ergebnisse finden sich in Abbildung 4.47 in der ebenfalls die Batch-Fermentation dargestellt ist.

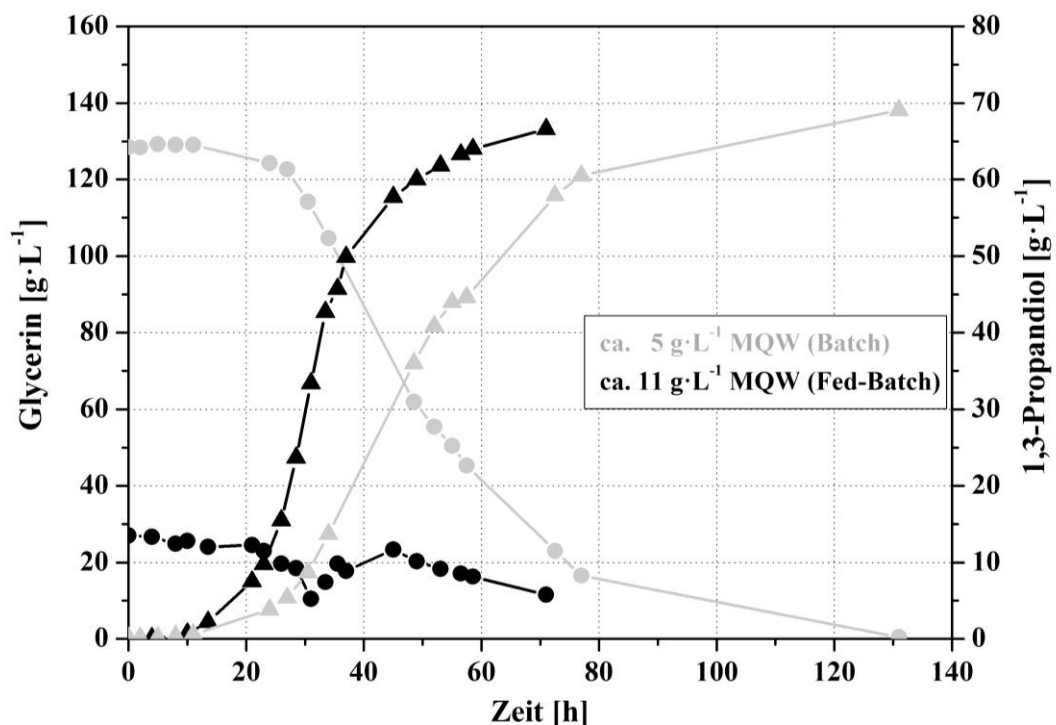


Abbildung 4.47: Glycerin- (Kreis) und 1,3-PD-Konzentrationen (Dreieck) für Batch bzw. Fed-Batch Fermentationen von AKR 102a mit Pharmaglycerin und Maisquellwasser

Wie bereits für die zuvor getesteten Ersatzstoffe gezeigt, führt der Wechsel von Batch auf Fed-Batch zu einer Beschleunigung des Wachstums und damit zu einer schnelleren Bildung von 1,3-Propandiol. Die deutliche Erhöhung der eingesetzten Gesamtmenge an Maisquellwasser von $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Batch) auf $11 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Fed-Batch) führte im Beobachtungszeitraum nicht zu einer Steigerung der 1,3-PD-Konzentration (siehe Tabelle 4.18).

Tabelle 4.18: Ergebnisse der Batch bzw. Fed-Batch Fermentationen von AKR 102a mit Pharmaglycerin und Maisquellwasser (Gesamteinsatz)

	Batch	Fed-Batch
Maisquellwasser _{ges}	$5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$	$11 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$
Zeit [h]	131	71
1,3-PD _{end} [$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$]	69,1	66,6
Glycerin _{end} [$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$]	0,4	11,5
Q _{ges} [$\text{g}_{1,3\text{-PD}}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$]	0,5	0,9
Q _{max} [$\text{g}_{1,3\text{-PD}}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$]	1,5	3,9
Y [$\text{g}_{1,3\text{-PD}}\cdot\text{g}_{\text{Gly}}^{-1}$]	0,538	0,539
Y [$\text{mol}_{1,3\text{-PD}}\cdot\text{mol}_{\text{Gly}}^{-1}$]	0,652	0,652

Das Erreichen nahezu gleichbleibender 1,3-PD-Konzentrationen von $67 - 69 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ könnte zwei Ursachen haben. Einerseits eine durch die Verdünnung des Mediums mit Feed ausgelöste Limitierung, welche nicht durch die Inhaltsstoffe des Maisquellwassers ausgeglichen werden kann. Andererseits könnte es während der Medienautoklavierung in Folge des höheren Zuckergehaltes des Maisquellwassers zur Bildung größer Mengen an Maillard-Produkten gekommen sein. Deren potenziell wachstumsinhibierende Wirkung kann z. B. auf die Bindung von Spurenelementen oder gebildetes antimikrobiell wirksames Hydroxymethylfurfural (HMF) zurückgeführt werden [Einarsson et al. 1983].

Zusammenfassung der Fed-Batch Fermentationen mit Ersatzstoffen

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die drei mit dem Fed-Batch Verfahren getesteten Substanzen (Fischmehl, Sojaproteinkonzentrat, Maisquellwasser) prinzipiell geeignete Hefeextraktersatzstoffe darstellen. Durch die für hohe 1,3-PD-Konzentrationen notwendigen Mengen an Fischmehl egalisiert sich jedoch der Kostenvorteil gegenüber einer Fermentation mit reduziertem Hefeextrakt. Die mit Sojaproteinkonzentrat (SPK) im Batch erzielten $67 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 1,3-PD konnten durch eine Fed-Batch Fermentation mit gesteigerter SPK-Konzentration nur

marginal übertroffen werden. Eine deutliche Erhöhung der Menge an SPK sowie die Addition geringer Mengen an Hefeextrakt führten nur zu einer geringfügigen Konzentrationserhöhung auf ca. $71 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 1,3-PD. Die Ursache hierfür könnte entweder eine Limitierung oder ein Akkumulation wachstumshemmender Substanzen aus dem Sojaproteinkonzentrat sein. Der Einsatz von Maisquellwasser lieferte die vielversprechendsten Ergebnisse, da eine relative hohe 1,3-PD-Konzentration mit der höchsten Ausbeute erzielt wurde. Weiterhin ist es im Vergleich zu Fischmehl und Sojaproteinkonzentrat um ca. 85 % und damit signifikant preiswerter. Einer geringeren 1,3-PD-Konzentration und verlängerten Fermentationsdauer steht somit eine höhere Ausbeute verbunden mit dem erheblichen Kostenvorteil des Materials gegenüber. Im Hinblick auf eine angestrebte Kostenreduktion des Biokonversionsprozesses wird daher die Fed-Batch Fermentation mit Maisquellwasser mit dem Einsatz von Rohglycerin kombiniert.

4.11 Fed-Batch Fermentation mit Rohglycerin und HE-Ersatzstoff

Für die Fermentation mit vorbehandeltem Rohglycerin K602 (Scheidetrichter, Hydrotalcit) und Hefeextraktersatzstoff ($\text{RG}_{\text{K602}}^{25}$, 1 L-Maßstab) wurde Maisquellwasser ausgewählt. Es bietet in Folge seines niedrigen Einkaufspreises und der hohen erzielten Ausbeute (siehe Tabelle 4.18) ein bedeutendes Kosteneinsparungspotenzial. Analog zur Pharmaglycerin-fermentation wurde eine Startkonzentration von $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Maisquellwasser eingesetzt. Um einer potenziellen Limitierung in Folge des erhöhten Wassereintrages durch den Rohglycerin-feed bzw. der möglichen Bindung von Spurenelementen durch Maillard-Produkte entgegenzuwirken, wurden die $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Maisquellwasser des Rohglycerinfeeds mit den Bestandteilen des Mineralsalzmediums (exklusive Hefeextrakt, Cystein, Resazurin) ergänzt (siehe Tabelle 3.1). Der Feed beinhaltete somit gleiche Konzentrationen an Mineralsalzen und Spurenelementen wie das Mineralsalzmedium. Des Weiteren wurde die für Rohglycerin K602 optimierte pH-Regulierung mit 25 %iger Ammoniaklösung eingesetzt. Die Vorkultur wurde auf $\text{RG}_{\text{K602}}^{25} \text{HE}^{0,1}_{\text{Vial}}$ kultiviert. Der Gesamteinsatz an Maisquellwasser belief sich auf ca. $11 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ und bewegte sich damit in einer gravimetrisch vergleichbaren Größenordnung zum Hefeextrakteinsatz der optimierten Rohglycerinfermentation (siehe Kap. 4.9.5). Die Verläufe sowohl der optischen Dichte als auch der Glycerin- bzw. 1,3-PD-Konzentrationen sind in Abbildung 4.48 dargestellt.

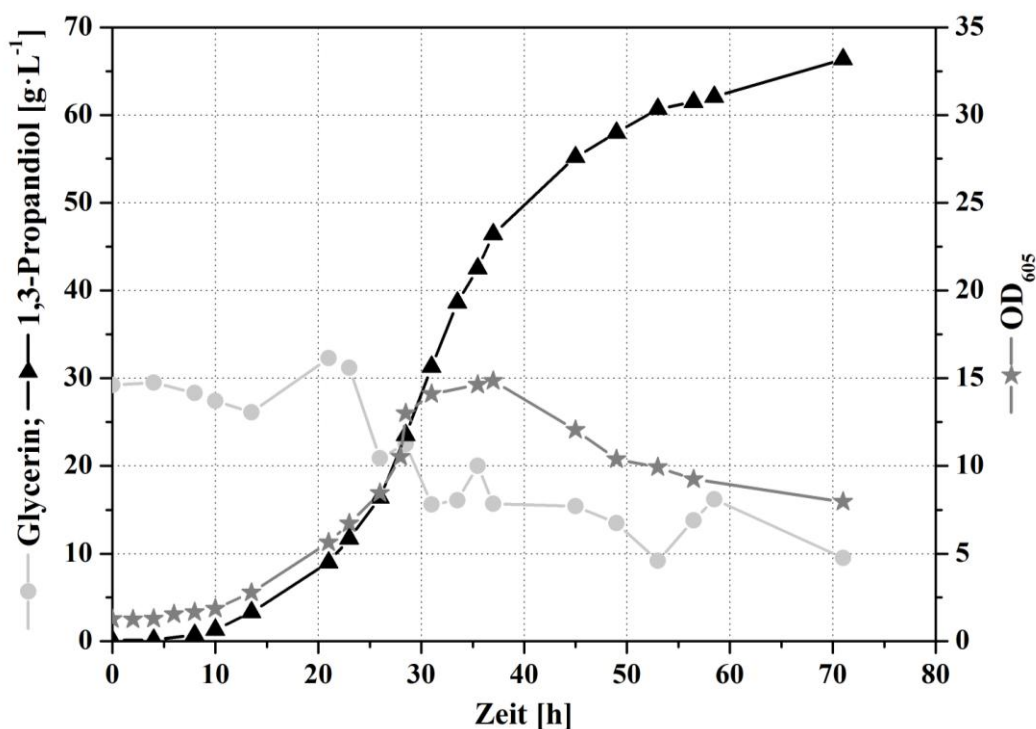


Abbildung 4.48: Fed-Batch Fermentation von AKR 102a mit vorbehandeltem RG K602 und Maisquellwasser (MQW_{ges} 11 g·L⁻¹) im 1 L-Maßstab

Zum Ende des Beobachtungszeitraumes nach 71 h wurde eine maximale 1,3-PD-Konzentration von 66,4 g·L⁻¹ erreicht. Die Gesamtproduktivität belief sich somit auf 0,9 g_{1,3-PD}·L⁻¹·h⁻¹ bei einer maximalen Produktivität von 3 g_{1,3-PD}·L⁻¹·h⁻¹. Die Ausbeuten lagen bei 0,538 g_{1,3-PD}·g_{Gly}⁻¹ bzw. 0,651 mol_{1,3-PD}·mol_{Gly}⁻¹. Nach 71 h wurden eine Essigsäurekonzentration von 7,3 g·L⁻¹ und Buttersäurekonzentration von 12,5 g·L⁻¹ erhalten. Die Milchsäurekonzentration lag auf einem konstant niedrigen Niveau von 0,2 g·L⁻¹. Die Ergebnisse zeigen, dass auch für eine Rohglycerinfermentation der Hefeextrakt erfolgreich substituiert werden kann. Der erhaltene Verlauf der 1,3-PD-Konzentration ist annähernd identisch mit dem der Fed-Batch Fermentation von Maisquellwasser und Pharmaglycerin (siehe Anhang Abbildung 6.4). Da trotz Nachführung von Medienbestandteilen keine höhere Endkonzentration an 1,3-PD erreicht werden konnte, liegt die Vermutung nahe, dass der Limitierung des Wachstums andere Ursachen zugrunde liegen.

Vergleicht man die mit Maisquellwasser und Rohglycerin K602 erhaltenen Ergebnisse mit der optimierten Rohglycerinfermentation mit Hefeextrakt (siehe Kap. 4.9.5), so ist eine deutliche Verlängerung der Fermentationsdauer sowie eine niedrigere 1,3-PD-Konzentration erkennbar (siehe Tabelle 4.19). Dem gegenüber steht jedoch eine Steigerung der Ausbeute um 5 % sowie eine Senkung der Kosten für das Co-Substrat von über 95 %.

Tabelle 4.19: Ergebnisse der Fed-Batch Fermentationen von AKR 102a mit Rohglycerin und Hefeextrakt bzw. Maisquellwasser (Gesamteinsatz)

	HE	MQW
Gesamteinsatz	10,5 g·L ⁻¹	11 g·L ⁻¹
Zeit [h]	32,5	71,0
1,3-PD _{end} [g·L ⁻¹]	76,2	66,4
Glycerin _{end} [g·L ⁻¹]	12,5	9,5
Q _{ges} [g _{1,3-PD} ·L ⁻¹ ·h ⁻¹]	2,3	0,9
Q _{max} [g _{1,3-PD} ·L ⁻¹ ·h ⁻¹]	7,6	3,0
Y [g _{1,3-PD} ·g _{Gly} ⁻¹]	0,514	0,538
Y [mol _{1,3-PD} ·mol _{Gly} ⁻¹]	0,622	0,651

Die im Vergleich zu den Hefeextrakt-Fermentationen mit Pharma- als auch Rohglycerin erreichte höhere Ausbeute ist möglicherweise auf den Zuckeranteil des Maisquellwassers zurückzuführen. Glucose kann beispielsweise der Energiegewinnung dienen, wodurch mehr Glycerin zur Wiedergewinnung der Reduktionsäquivalente zu 1,3-PD umgesetzt werden kann [Abbad-Andaloussi et al. 1998].

Weitere Untersuchungen sind notwendig um die Fermentation mit Maisquellwasser zu optimieren. Neben einer möglichen Nährstofflimitierung muss überprüft werden, inwiefern eine Sterilisation des für den Feed bestimmten Maisquellwassers notwendig ist, bzw. eingespart werden kann. Kombiniert mit einer geringeren MQW-Startkonzentration ließe sich somit der Eintrag potenziell wachstumsinhibierender Maillard-Produkte signifikant reduzieren. Weiterhin ließe sich in Folge des niedrigen Einkaufspreises die Menge des eingesetzten Hefeextraktersatzstoffes deutlich erhöhen. Dies würde nur in einer marginalen Verringerung des Kostenvorteils gegenüber dem Einsatz von Hefeextrakt resultieren.

4.12 Zusammenfassung der Ergebnisse mit AKR 102a

Mit AKR 102a wurde im Rahmen der Stammauswahl ein Mikroorganismus gefunden, der sich durch eine sehr hohe Produktivität und erzielte 1,3-PD-Konzentration auszeichnet. Durch Prozessoptimierung (Vorbehandlung Rohglycerin; Laugenwechsel) konnte dies auch bei Nutzung von Rohglycerin der niedrigsten Aufarbeitungsstufe erreicht werden. Die mit AKR 102a sowohl mit Pharma- als auch Rohglycerin erzielten 1,3-PD-Konzentrationen und Produktivitäten gehören zu den höchsten für natürliche Produzenten publizierten Werten. Bei

gleichzeitiger Verringerung des experimentellen und materiellen Aufwandes wurde die Rohglycerinfermentation erfolgreich in den 200 L-Maßstab überführt.

Der geringe Bedarf an Supplinen eröffnet für Fermentationen mit AKR 102a weiteres Optimierungspotenzial in Hinblick auf eine wirtschaftliche industrielle Anwendung. Neben einer deutlichen Reduktion des Hefeextrakteinsatzes konnten auch mittels definierter Substanzen oder eines breiten Spektrums komplexer Ersatzstoffe pflanzlichen oder tierischen Ursprungs hohe Konzentrationen an 1,3-Propanediol erzielt werden. Die Ergebnisse einer kombinierten Fermentation zeigen, dass auch für eine Rohglycerinfermentation der Hefeextrakt erfolgreich substituiert werden kann. Durch weiterführende Optimierungsschritte ist eine Steigerung der 1,3-PD-Konzentrationen und Produktivität denkbar.

5 Schlussfolgerungen und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mit den aus mehreren Screenings hervorgegangenen 1,3-PD-Produzenten AKR 17a und AKR 102a unter optimierten Bedingungen 1,3-PD-Konzentrationen erzielt, welche zu den höchsten bisher publizierten Werten gehören. Dies gilt ebenso für die Ergebnisse der Fermentationen mit Rohglycerin der niedrigsten Aufarbeitungsstufe. Für AKR 102a konnte dabei durch eine einfache Vorbehandlung des Rohglycerins sowie eine erfolgreiche Anpassung der Prozessführung (Lauge) und des Mediums (N-Quelle) eine deutliche Beschleunigung der 1,3-PD-Bildung erreicht werden. Die zum Einsatz gekommene Entfernung der fettsäurehaltigen Schwimmschicht lässt sich mittels Dekanter einfach in einen industriellen Prozess integrieren. Da es sich bei dem genutzten Rohglycerin um ein Nebenprodukt der Rapsöl-basierten Biodieselproduktion handelt, könnte zusätzlich die Eignung von Rohglycerinen anderen Ursprungs überprüft werden, um weitere Glycerinquellen zu erschließen. Auf die Verwertbarkeit der einzelnen Rohglycerine können sich sowohl die unterschiedlichen Fettsäureprofile der verwendeten Öle (z. B. Raps-, Soja-, Palmöl) als auch andere prozessbedingte Verunreinigungen (z. B. Katalysatoren) stark auswirken.

Neben den sehr guten Ergebnissen bei Wachstum auf einem hefeextrakthaltigen Medium zeigte AKR 102a die Fähigkeit mit definierten Substanzen oder einer großen Bandbreite alternativer Hefeextraktersatzstoffe zu wachsen. Die hierfür in dieser Arbeit benutzten Materialien stellen nur eine kleine Auswahl eines sehr breit gefächerten Spektrums dar. Weiterhin kann deren Zusammensetzung stark vom Hersteller, Herstellungsverfahren bzw. dem Ausgangsrohstoff (z. B. Pflanzenspezies) abhängen. Im Rahmen weiterführender Untersuchungen sollten daher Variationen der bereits getesteten Materialien zur Anwendung (z. B. Sojamehl) kommen, bzw. bisher noch nicht eingesetzte Materialien (z. B. Reststoffe der Palmölindustrie) auf ihre Eignung untersucht werden. Für die Hefeextraktersatzstoffe selbst sollte auch über einen Aufschluss (mechanisch, chemisch, thermisch, enzymatisch) nachgedacht werden, um deren Potenzial weiter zu erhöhen. Eine geeignete Aufbereitung der Ersatzstoffe könnte zu einer Verkürzung der Fermentationsdauer bzw. Erhöhung der 1,3-PD-Konzentration beitragen. Hierbei darf die ökonomische Eignung jedoch nicht außer Acht

gelassen werden. Weiterhin ist eine Wiederverwendung der gebildeten Biomasse als Nährstoffquelle denkbar, wodurch zusätzlich entstehende Prozessabfälle reduziert werden könnten. Über Kombinationen verschiedener Hefeextraktersatzstoffe ließen sich möglicherweise weitere Ergebnisverbesserungen herbeiführen. Parallel zu einer kompletten oder teilweisen Substitution des Hefeextraktes sollte ebenfalls der erfolgreiche Ansatz der Hefeextraktreduktion weiterverfolgt werden.

Bereits im Rahmen der Stammauswahl muss zukünftig neben der 1,3-PD-Konzentration, Ausbeute und Rohglycerintoleranz die Fähigkeit eines Mikroorganismus auf einer Vielzahl potenzieller Hefeextraktersatzstoffe wachsen zu können, berücksichtigt werden. Weiterhin muss die potenzielle Limitierung von Nährstoffen und Spurenelementen sowie eine mögliche Wachstumsinhibierung bei Einsatz von Rohglycerin bzw. Hefeextraktersatzstoffen weiter untersucht werden.

Alle dargestellten Punkte bieten Ansatzmöglichkeiten für eine weitere Verbesserung der Prozessführung zur Erreichung eines ökonomischen und wettbewerbsfähigen Biokonversionsprozesses.

6 Anhang



Abbildung 6.1: Glycerine verschiedener Aufarbeitungsstufen (Biopetrol Schwarzheide GmbH), RG K501, RG technisch, RG geblichen und Pharmaglycerin

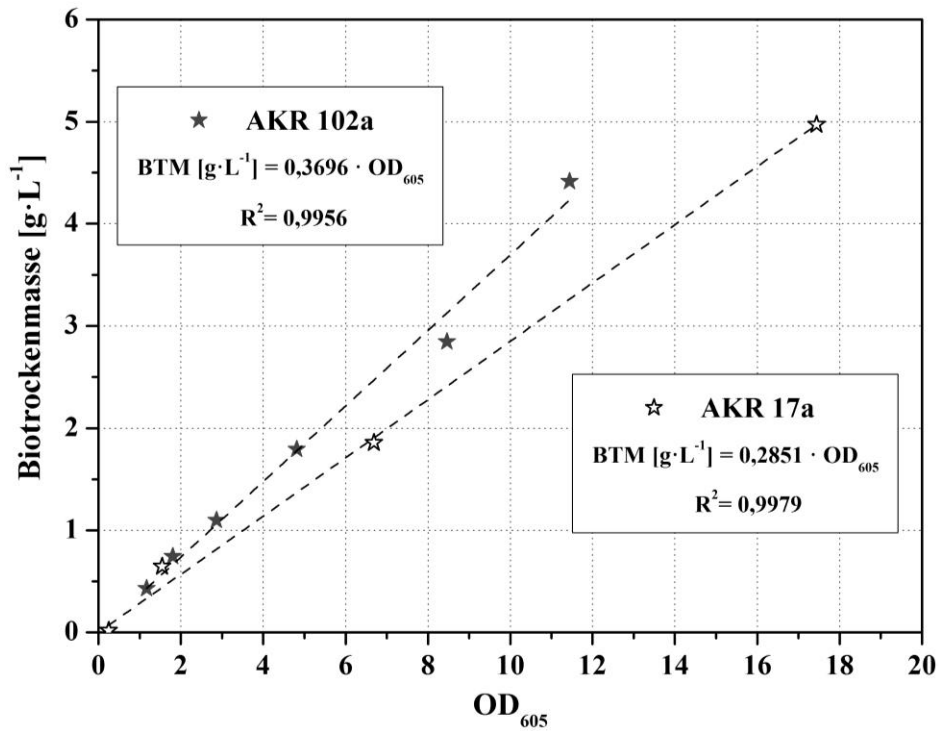


Abbildung 6.2: Korrelation OD_{605} zu Biotrockenmasse für AKR 17a und AKR 102a

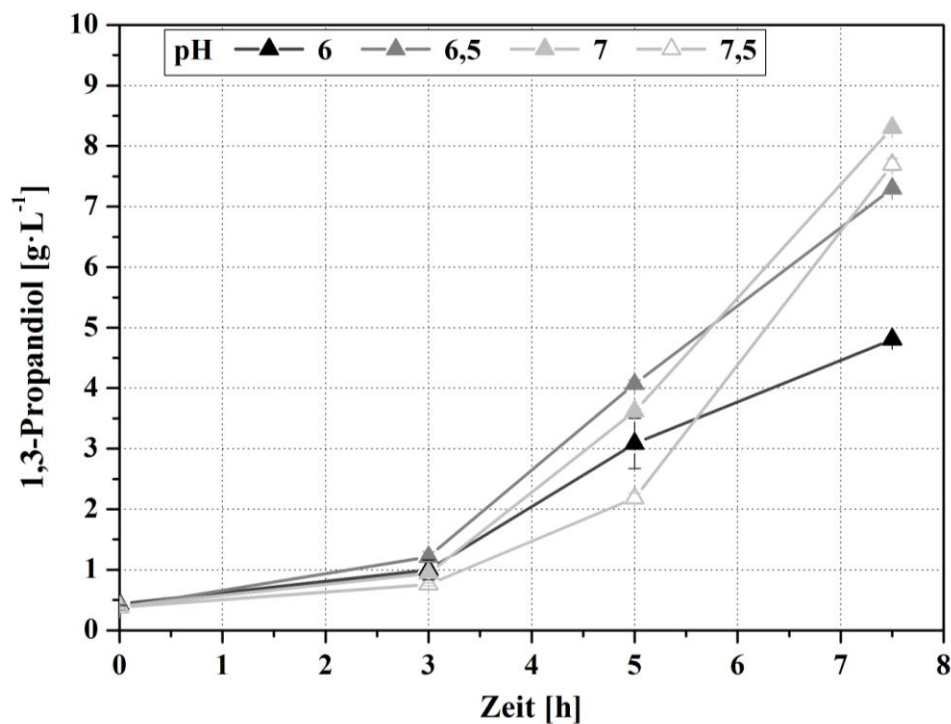


Abbildung 6.3: 1,3-Propanediolkonzentration bei Kultivierung von AKR 102a auf PG²⁵HE¹_{Vial} mit variablen Start-pH Werten

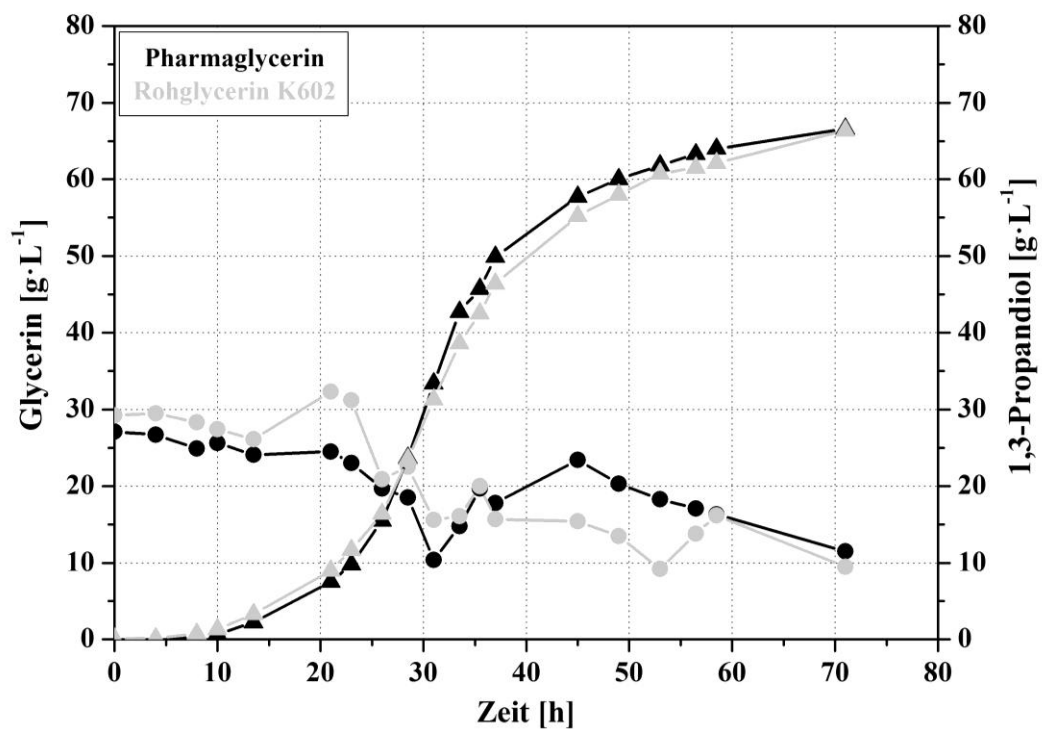


Abbildung 6.4: Glycerin- (Kreis) und 1,3-PD-Konzentrationen (Dreieck) für Fed-Batch Fermentationen von AKR 102a mit Pharma- bzw. Rohglycerin und Maisquellwasser

Tabelle 6.1: Liste der wichtigsten verwendeten Chemikalien

Chemikalien	Hersteller	Zusatz
1,3-Propandiol	Alfa Aesar	99 %
Biotin	Sigma	-
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	Merck	zur Analyse; 99 %
CaSO ₄ · 2 H ₂ O	Fluka	Reinst
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	Fluka	≥ 98 %
CuCl ₂ · 2 H ₂ O	Merck	zur Analyse
D-Ca-Pantothenat	Merck	für biochemische Zwecke
FeCl ₃ · 4 H ₂ O	Merck	wasserfrei, zur Synthese
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	Merck	zur Analyse
Folsäure	Merck	für biochemische Zwecke
Glycerin	Carl Roth	98 %
H ₃ BO ₃	Riedel-de Haën	zur Analyse
Hefeextrakt	Merck	granuliert für die Mikrobiologie
H ₂ SO ₄	Riedel-de Haën	Fixanal
KH ₂ PO ₄	Merck	zur Analyse
L-Cystein-Hydrochlorid	Merck	≥ 99,5
Liponsäure	Merck	-
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	Fluka	≥ 99,5 %
MnCl ₂ · 4 H ₂ O	Merck	zur Analyse
NaCl	Merck	zur Analyse
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	Merck	zur Analyse
NaOH	Merck	zur Analyse; Plätzchen
Na ₂ SeO ₃ · 5 H ₂ O	Fluka	zur Analyse
NH ₄ Cl	Merck	zur Analyse
(NH ₄) ₂ SO ₄	Merck	für biochemische Zwecke
NiCl ₂ · 6 H ₂ O	Fluka	zur Analyse
Nikotinsäure	Merck	HPLC-Grade
Nitrilotriessigsäure	Merck	zur Analyse
Pyridoxin-HCl	Fluka	reinst; 99 %
p-Aminobenzoesäure	Fluka	zur Synthese
Resazurin-Natriumsalz	Sigma	-
Riboflavin	Merck	für biochemische Zwecke
Salzsäure	Merck	Zur Analyse; 37 % rauchend
Thiamin-HCl · 2 H ₂ O	Sigma	-
VitaminB ₁₂ Cyanocobalamin	Merck	97 %
ZnCl ₂	Merck	zur Analyse

Tabelle 6.2: Gesamt-Stickstoffgehalt (nach Kjeldahl) und Preis pro Tonne für Hefeextrakt bzw. komplexe Ersatzstoffe (Herstellerauskunft)

	Gesamt-N	Preis [€ pro t]
HE-Merck	11,5	4000 - 8000
Weizenkleber	12,6	n. b.
Protigrain	4,8	130
Glutamin	10,7	500
Fleischknochenmehl	7,3	120 - 150
Sojaproteinkonzentrat	8,9	800 - 900
Fischmehl	10,3	1000
Griebenmehl	13,9	615
Kartoffelprotein	12,4	850
Maisquellwasser	n. b.	130*

*Maddipati et al. 2011

n. b. - nicht bekannt

7 Literaturverzeichnis

- Abbad-Andaloussi S, Durr C, Raval G, Petitedemange H (1996) Carbon and electron flow in *Clostridium butyricum* grown in chemostat culture on glycerol and on glucose. *Microbiology* 142 (5): 1149-1158
- Abbad-Andaloussi S, Amine J, Gerard P, Petitedemange H (1998) Effect of glucose on glycerol metabolism by *Clostridium butyricum* DSM 5431. *J Appl Microbiol* 84: 515-522
- Altat M, Naveena BJ, Reddy G (2007) Use of inexpensive nitrogen sources and starch for L(+) lactic acid production in anaerobic submerged fermentation. *Bioresour Technol* 98: 498-503
- Anand P, Saxena RK (2012) A comparative study of solvent-assisted pretreatment of biodiesel derived crude glycerol on growth and 1,3-propanediol production from *Citrobacter freundii*. *N Biotechnol* 29 (2): 199-205
- Asad-ur-Rehman, Saman WRG, Nomura N, Sato S, Matsumura M (2008) Pre-treatment and utilization of raw glycerol from sunflower oil biodiesel for growth and 1,3-propanediol production by *Clostridium butyricum*. *J Chem Technol Biotechnol* 83: 1072-1080
- Baltes W (1970) Über Zusammensetzung und Nachweis von Hefeextrakten. *Z Lebensm Unters Forsch* 145: 149-155
- Barbirato F, Himmi EH, Conte T, Bories A (1998) 1,3-propanediol production by fermentation: An interesting way to valorize glycerin from the ester and ethanol industries. *Ind Crops Prod* 7: 281-289
- Belcher LA, Muska CF, DeSalvo JW (2010) Evaluating 1,3-propanediol for potential skin effects. *Cosmet Toiletries* 125 (5): 81-86
- Biebl H (1991) Glycerol fermentation of 1,3-Propanediol by *Clostridium butyricum* - Measurement of product inhibition by use of a pH-auxostat. *Appl Microbiol Biotechnol* 35: 701-705

- Biebl H, Marten S, Hippe H, Deckwer WD (1992) Glycerol conversion to 1,3-propanediol by newly isolated *Clostridia*. Appl Microbiol Biotechnol 36: 592-597
- Biebl H, Menzel K, Zeng AP, Deckwer WD (1999) Microbial production of 1,3-propanediol. Appl Microbiol Biotechnol 52: 289-297
- Biebl H und Sproer C (2002) Taxonomy of the glycerol fermenting clostridia and description of *Clostridium diolis* sp nov. Syst Appl Microbiol 25: 491-497
- Bock R (2004) Biokonversion von Glycerin zu 1,3-Propandiol mit freien und immobilisierten Mikroorganismen. Dissertation. TU Braunschweig
- Boenigk R, Bowien S, Gottschalk G (1993) Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol in continuous cultures of *Citrobacter freundii*. Appl Microbiol Biotechnol 38: 453-457
- Bowker M, Davies PR, Al-Mazroai LS (2009) Photocatalytic reforming of glycerol over gold and palladium as an alternative fuel source. Catal Lett 128: 253-255
- Carmines EL und Gaworski CL (2005) Toxicological evaluation of glycerin as a cigarette ingredient. Food Chem Toxicol 43: 1521-1539
- Chatzifragkou A, Dietz D, Komaitis M, Zeng AP, Papanikolaou S (2010) Effect of biodiesel-derived waste glycerol impurities on biomass and 1,3-propanediol production of *Clostridium butyricum* VPI 1718. Biotechnol Bioeng 107 (1): 76-84
- Chatzifragkou A, Papanikolaou S, Dietz D, Doulgeraki AI, Nychas GJE, Zeng AP (2011) Production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum* growing on biodiesel-derived crude glycerol through a non-sterilized fermentation process. Appl Microbiol Biotechnol 91: 101-112
- Chen X, Zhang DJ, Qi WT, Gao SJ, Xiu ZL, Xu P (2003) Microbial fed-batch production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* under micro-aerobic conditions. Appl Microbiol Biotechnol 63: 143-146
- Cheng KK, Liu DH, Sun Y, Liu WB (2004) 1,3-propanediol production by *Klebsiella pneumoniae* under different aeration strategies. Biotechnol Lett 26 (11): 911-915
- Cheng KK, Zhang JA, Liu DH, Sun Y, Liu HJ, Yang MD, Xu JM (2007) Pilot-scale production of 1,3-propanediol using *Klebsiella pneumoniae*. Process Biochem 42: 740-744

- Colin T, Bories A, Moulin G (2000) Inhibition of *Clostridium butyricum* by 1,3-propanediol and diols during glycerol fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol* 54: 201-205
- Colin T, Bories A, Lavigne C, Moulin G (2001) Effects of acetate and butyrate during glycerol fermentation by *Clostridium butyricum*. *Curr Microbiol* 43: 238-243
- da Silva G, Mack M, Contiero J (2009) Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnol Adv* 27: 30-39
- Dabrock B, Bahl H, Gottschalk G (1992) Parameters affecting solvent production by *Clostridium pasteurianum*. *Appl Environ Microbiol* 58: 1233-1239
- Douette AMD, Turn SQ, Wang W, Keffer VI (2007) Experimental investigation of hydrogen production from glycerin reforming. *Energy Fuels* 21: 3499-3504
- Dong XY, Xiu ZL, Li SA, Hou YM, Zhang DJ, Ren CS (2010) Dielectric barrier discharge plasma as a novel approach for improving 1,3-propanediol production in *Klebsiella pneumoniae*. *Biotechnol Lett* 32: 1245-1250
- Dubois V, Breton S, Linder M, Fanni J, Parmentier M (2007) Fatty acid profiles of 80 vegetable oils with regard to their nutritional potential. *Eur J Lipid Sci Technol* 109: 710-732
- Eaton RE, Boon WH, Smith CJ (2004) Chemical base for engine coolant / antifreeze with improved thermal stability properties. Patent Nr. US 6818146 B2. Shell Oil Company
- Einarsson H, Snygg BG, Eriksson C (1983) Inhibition of bacterial growth by maillard reaction products. *J Agric Food Chem* 31: 1043-1047
- Freund A (1881) Über die Bildung und Darstellung von Trimethylenalkohol aus Glycerin. *Monatsh Chem* 2: 636-641
- Forsberg CW (1987) Production of 1,3-propanediol from glycerol by *Clostridium acetobutylicum* and other *Clostridium* species. *Appl Environ Microbiol* 53: 639-643
- Gao MT, Hirata M, Toorisaka E, Hano T (2007) Lactic acid production with the supplementation of spent cells and fish wastes for the purpose of reducing impurities in fermentation broth. *Biochem Eng J* 36: 276-280

- Goncalves LMD, Ramos A, Almeida JS, Xavier AMRB, Carrondo MJT (1997) Elucidation of the mechanism of lactic acid growth inhibition and production in batch cultures of *Lactobacillus rhamnosus*. Appl Microbiol Biotechnol 48: 346-350
- Gong LF, Lu YA, Ding YJ, Lin RH, Li JW, Dong WD, Wang T, Chen WM (2010) Selective hydrogenolysis of glycerol to 1,3-propanediol over a Pt/WO₃/TiO₂/SiO₂ catalyst in aqueous media. Appl Catal A Gen 390 (1-2): 119-126
- González-Pajuelo M, Andrade JC, Vasconcelos I (2004) Production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum* VPI 3266 using a synthetic medium and raw glycerol. J Ind Microbiol Biotechnol 31: 442-446
- González-Pajuelo M, Meynial-Salles I, Mendes F, Andrade JC, Vasconcelos I, Soucaille P (2005) Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum* for the industrial production of 1,3-propanediol from glycerol. Metab Eng 7: 329-336
- González-Pajuelo M, Andrade JC, Vasconcelos I (2005b) Production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum* VPI 3266 in continuous cultures with high yield and productivity. J Ind Microbiol Biotechnol 32: 391-396
- Gu YL and Jerome F (2010) Glycerol as a sustainable solvent for green chemistry. Green Chem 12: 1127-1138
- Günzel B, Yonsel S, Deckwer WD (1991) Fermentative production of 1,3-propanediol from glycerol by *Clostridium butyricum* up to a scale of 2 m³. Appl Microbiol Biotechnol 36: 289-294
- Hao J, Lin R, Zheng Z, Liu H, Liu D (2008) Isolation and characterization of microorganisms able to produce 1,3-propanediol under aerobic conditions. World J Microbiol Biotechnol 24: 1731-1740
- Hartlep M (2006) Prozessentwicklung und Metabolic Engineering der mikrobiellen Produktion von 1,3-Propandiol. Dissertation. TU-Braunschweig
- Hartlep M und Zeng AP (2002) Fedbatch-Verfahren für die mikrobielle Herstellung von 1,3-Propandiol in *Klebsiella pneumoniae* und *Clostridium butyricum*. Chem Ing Tech 75: 663-664
- Himmi EH, Bories A, Barbirato F (1999) Nutrient requirements for glycerol conversion to 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum*. Bioresour Technol 67: 123-128

- Hirschmann S, Baganz K, Koschik I, Vorlop KD (2005) Development of an integrated bioconversion process for the production of 1,3-propanediol from raw glycerol waters. *Landbauforschung Volkenrode* 55: 261-267
- Homann T, Tag C, Biebl H, Deckwer WD, Schink B (1990) Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol by *Klebsiella* and *Citrobacter* strains. *Appl Microbiol Biotechnol* 33: 121-126
- Hujanen M and Linko YY (1996) Effect of temperature and various nitrogen sources on L(+) lactic acid production by *Lactobacillus casei*. *Appl Microbiol Biotechnol* 45: 307-313
- Joerger M, Fenyvesi G, Poladi R, Miller R (2010) Bio-Derived 1,3-Propanediol and its conjugate esters as natural and non-irritating solvents for biomass-derived extracts, fragrance concentrates, and oils. Patent Nr. US 7759393 B2. DuPont & Lyle Bio Products Company, LLC
- Jun SA, Moon C, Kang CH, Kong SW, Sang BI, Um Y (2010) Microbial fed-batch production of 1,3-propanediol using raw glycerol with suspended and immobilized *Klebsiella pneumoniae*. *Appl Biochem Biotechnol* 161: 491-501
- Katsuko A (2010) A printing method employing an ink jet recording technique. Patent Nr. US 2010/0086690 A1. Seiko Epson Corporation
- Kaufhold S (2001) Untersuchungen zur Eignung von natürlich alterierten sowie mit Oxalsäure aktivierten Bentoniten als Bleicherde für Pflanzenöle. Dissertation RWTH Aachen
- Kim CH, Seo JW, Heo SY, Seo MY, Oh BR, Baek, JO, Seo PS, Choi MH (2010) Mutant blocked in glycerol oxidation pathway for producing 1,3-propanediol. Patent Nr. WO 2010/064744 A1. Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology
- Kraus GA (2008) Synthetic methods for the preparation of 1,3-propanediol. *Clean-Soil Air Water* 36 (8): 648-651
- Khuller GK und Goldfine H (1974) Phospholipids of *Clostridium butyricum*. V. Effects of growth temperature on fatty-acid, alk-1-enyl ether group, and phospholipid composition. *J Lipid Res* 15: 500-507
- Kurian JV (2005) A new polymer platform for the future - Sorona[®] from corn derived 1,3-propanediol. *J Polym Environ* 13 (2): 159-167

- Kwon S, Lee PC, Lee EG, Chang YK, Chang N (2000) Production of lactic acid by *Lactobacillus rhamnosus* with vitamin-supplemented soybean hydrolysate. *Enzyme Microb Technol* 26: 209-215
- Laffend LA, Nagarajan V, Nakamura CW (1997) Bioconversion of a fermentable carbon source to 1,3-propanediol by a single microorganism. Patent Nr. 5686276. E.I. DuPont des Nemours and Company
- Lafon-Lafourcade S, Geneix C, Ribéreau-Gayon P (1984) Inhibition of alcoholic fermentation of grape must by fatty acids produced by yeasts and their elimination by yeast ghosts. *Appl Environ Microbiol* 47: 1246-1249
- Lammers PJ, Kerr BJ, Weber TE, Dozier WA, Kidd MT, Bregendahl K, Honeyman MS (2008) Digestible and metabolizable energy of crude glycerol for growing pigs. *J Anim Sci* 86: 602-608
- Li Z, Han L, Ji YZ, Wang XN, Tan TW (2010) Fermentative production of L-lactic acid from hydrolysate of wheat bran by *Lactobacillus rhamnosus*. *Biochem Eng J* 49: 138-142
- Liu HJ, Zhang DJ, Xu YH, Mu Y, Sun YQ, Xiu ZL (2007) Microbial production of 1,3-propanediol from glycerol by *Klebsiella pneumoniae* under micro-aerobic conditions up to a pilot scale. *Biotechnol Lett* 29 (8): 1281-1285
- Liu HJ, Ou XJ, Zhou S, Liu DH (2010) Microbial 1,3-propanediol, its copolymerization with terephthalate, and applications. *Microbiological Monographs* 14: 405-425
- Lopez JAS, Santos MDM, Perez AFC, Martin AM (2009) Anaerobic digestion of glycerol derived from biodiesel manufacturing. *Bioresour Technol* 100: 5609-5615
- Lu ZD, He F, Shi Y, Lu MB, Yu LJ (2010) Fermentative production of L(+)-lactic acid using hydrolyzed acorn starch, persimmon juice and wheat bran hydrolysate as nutrients. *Bioresour Technol* 101: 3642-3648
- Ma FR und Hanna MA (1999) Biodiesel production: a review. *Bioresour Technol* 70: 1-15
- Maddipati P, Atiyeh HK, Bellmer DD, Huhnke RL (2011) Ethanol production from syngas by *Clostridium* strain P11 using corn steep liquor as a nutrient replacement to yeast extract. *Bioresour Technol* 102: 6494-6501

- Maervoet VET, DeMey M, Beauprez J, De Maeseneire S, Soetaert WK (2011) Enhancing the microbial conversion of glycerol to 1,3-propanediol using metabolic engineering. *Org Process Res Dev* 15 (1): 189-202
- Marchetti JM, Miguel VU, Errazu AF (2007) Possible methods for biodiesel production. *Renew Sust Energ Rev* 11: 1300-1311
- Mendes FS, Gonzales-Pájuelo M, Cordier H, Francois JM, Vasconcelos I (2011) 1,3-Propanediol production in a two-step process fermentation from renewable feedstock. *Appl Microbiol Biotechnol* 92 (3): 519-527
- Menzel K, Zeng AP, Deckwer WD (1997) High concentration and productivity of 1,3-propanediol from continuous fermentation of glycerol by *Klebsiella pneumoniae*. *Enzyme Microb Technol* 20: 82-86
- Menzel U und Gottschalk G (1985) The internal-pH of *Acetobacterium wierinage* and *Acetobacter aceti* during growth and production of acetic acid. *Arch Microbiol* 143: 47-51
- Moon C, Ahn JH, Kim SW, Sang BI, Um Y (2010) Effect of biodiesel-derived raw glycerol on 1,3-propanediol production by different microorganisms. *Appl Biochem Biotechnol* 161: 502-510
- Mu Y, Teng H, Zhang DJ, Wang W, Xiu ZL (2006) Microbial production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* using crude glycerol from biodiesel preparations. *Biotechnol Lett* 28: 1755-1759
- Nakamura CE und Whited GM (2003) Metabolic engineering for the microbial production of 1,3-propanediol. *Curr Opin Biotechnol* 14: 454-459
- Otte B, Grunwaldt E, Mahmoud O, Jennewein S (2009) Genome shuffling in *Clostridium diolis* DSM 15410 for improved 1,3-propanediol production. *Appl Environ Microbiol* 75 (24): 7610-7616
- Page MA, Sunkara HB, Van Gorp JJ (2009) Unsaturated polyester resin compositions comprising 1,3-propanediol. Patent Nr. US 2009/0312485 A1. E.I. DuPont des Nemours and Company
- Papanikolaou S, Ruiz-Sanchez P, Pariset B, Blanchard F, Fick M (2000) High production of 1,3-propanediol from industrial glycerol by a newly isolated *Clostridium butyricum* strain. *J Biotechnol* 77: 191-208

- Papanikolaou S, Fakas S, Fick M, Chevalot I, Galiotou-Panayotou M, Komaitis M, Marc I, Aggelis G (2008) Biotechnological valorisation of raw glycerol discharged after bio-diesel (fatty acid methyl esters) manufacturing process: Production of 1,3-propanediol, citric acid and single cell oil. *Biomass Bioenergy* 32: 60-71
- Parker LM, Milestone NB, Newman RH (1995) The use of hydrotalcite as an anion absorbent. *Ind Eng Chem Res* 34: 1196-1202
- Petitdemange E, Durr C, Andaloussi SA, Raval G (1995) Fermentation of raw glycerol to 1,3-propanediol by new strains of *Clostridium butyricum*. *J Ind Microbiol* 15: 498-502
- Pflugmacher U and Gottschalk G (1994) Development of an immobilized cell reactor for the production of 1,3-propanediol by *Citrobacter freundii*. *Appl Microbiol Biotechnol* 41: 313-316
- Rahmat N, Abdullah AZ, Mohamed AR (2010) Recent progress on innovative and potential technologies for glycerol transformation into fuel additives: A critical review. *Renew Sust Energ Rev* 14: 987-1000
- Reimann A und Biebl H (1996) Production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum* DSM 5431 and product tolerant mutants in fedbatch culture: Feeding strategy for glycerol and ammonium. *Biotechnol Lett* 18: 827-832
- Ringel AK (2012) Screening-Strategien für mikrobielle Hochleistungsstämme am Beispiel der 1,3-Propanediol-Produktion aus Rohglycerin. Dissertation. TU-Braunschweig
- Ringel AK, Wilkens E, Hortig D, Willke T, Vorlop KD (2012) An improved screening method for microorganisms able to convert crude glycerol to 1,3-propanediol and to tolerate high product concentrations. *Appl Microbiol Biotechnol* 93 (3): 1049-1056
- Saint-Amans S, Perlot P, Goma G, Soucaille P (1994) High production of 1,3-propanediol from glycerol by *Clostridium butyricum* VPI 3266 in a simply controlled fed-batch system. *Biotechnol Lett* 16: 831-836
- Saxena RK, Anand P, Saran S, Isar J (2009) Microbial production of 1,3-propanediol: Recent developments and emerging opportunities. *Biotechnol Adv* 27: 895-913
- Schuetz H und Radler F (1984) Anaerobic reduction of glycerol to 1,3-propanediol by *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus buchneri*. *Syst Appl Microbiol* 5: 169-178

- Sommer R (1998) Yeast extracts: production, properties and components. Food Australia 50: 181-183
- Sommer S, Blum H, Lippemeier J (2010) Aqueous coating systems based on physically drying urethane acrylates. Patent Nr. US 2010/0210757 A1. Bayer MaterialScience AG
- Soucaille P (2010) Process for the biological production of 1,3-propanediol from Glycerol with high yield. Patent Nr. US 2010/0137655 A1. Metabolic Explorer
- Stelmachowski M (2011) Utilization of glycerol, a by-product of the transestrification process of vegetable oils: A review. Ecol Chem Eng S 18 (1): 9-30
- Steuerding D (2010) Mikrobielle Herstellung von 1,3-Propandiol. Chem Unserer Zeit 44: 384-389
- Sun J, van den Heuvel J, Soucaille P, Qu Y, Zeng AP (2003) Comparative genomic analysis of dha regulon and related genes for anaerobic glycerol metabolism in bacteria. Biotechnol Prog 19 (2): 263-272
- Tag C (1990) Mikrobielle Herstellung von 1,3-Propandiol. Dissertation. Universität Oldenburg
- Tang XM, Tan YS, Zhu H, Zhao K, Shen W (2009) Microbial conversion of glycerol to 1,3-propanediol by an engineered strain of *Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol 75: 1628-1634
- Thames SF, Smith OW, Zhou L, Boon WH, Forscher TC, Gwyn DE (2002) Polyester triglycidyl isocyanurate resin powder coatings based on 1,3-propanediol. Patent Nr. US 2002/0061963 A1. Shell Oil Company
- Viala S, Dörr S, Hofacker S (2011) Polyurthane dispersions for hair dye. Patent Nr. US 2011/0117042 A1. Bayer MaterialScience AG
- Wagner HB und Ellis JR (1980) Dry-set mortars and method for improving the water retentivity thereof. Patent Nr. 4211572. Tile Council of America, Inc.
- Willke T und Vorlop K (2008) Biotransformation of glycerol into 1,3-propanediol. Eur J Lipid Sci Technol 110: 831-840

- Wittlich P (2001) Biotechnologische Herstellung von 1,3-Propanediol mit immobilisierten Zellen von *Chlostridium butyricum* NRRL 1024 und thermophilen Mikroorganismen. Dissertation. TU-Braunschweig
- Wu Z, Wang F, Wang Z, Wang X, Tan T (2010) Production of 1,3-propanediol from glycerol in the by-product of biological diesel oil by recombinant *Klebsiella pneumoniae*. Special Abstracts / J Biotechnol 150S: S368
- Xu YZ, Guo NN, Zheng ZM, Ou XJ, Liu HJ, Liu DH (2009) Metabolism in 1,3-propanediol fed-batch fermentation by a D-lactate deficient mutant of *Klebsiella pneumoniae*. Biotechnol Bioeng 104 (5): 965-972
- Yang G, Tian JS, Li JL (2007) Fermentation of 1,3-propanediol by a lactate deficient mutant of *Klebsiella oxytoca* under microaerobic conditions. Appl Microbiol Biotechnol 73: 1017-1024
- Yazdani SS und Gonzalez R (2007) Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. Curr Opin Biotechnol 18: 213-219
- Zeng AP, Ross A, Biebl H, Tag C, Günzel B, Deckwer WD (1994) Multiple product inhibition and growth modeling of *Clostridium butyricum* and *Klebsiella pneumoniae* in glycerol fermentation. Biotechnol Bioeng 44: 902-911
- Zeng AP (1996) Pathway and kinetic analysis of 1,3-propanediol production from glycerol fermentation by *Clostridium butyricum*. Bioprocess Eng 14: 169-175
- Zeng AP und Biebl H (2002) Bulk chemicals from biotechnology: the case of 1,3-propanediol production and new trends. Adv Biochem Eng Biotechnol 74: 239-259
- Zschau W (1985) Was ist Bleicherde? Fette, Seifen, Anstrichmittel 87: 506-508